HERSTELLUNG, CHARAKTERISIERUNG UND ANWENDUNG VON HLA-MUTANTEN DER HUMANEN ZELLINIE BJAB.B95.8.6

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
BÄRBEL SPRING GEB. MAIER
aus Eningen u. A.

1984

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546518_0005

HERSTELLUNG, CHARAKTERISIERUNG UND ANWENDUNG VON HLA-MUTANTEN DER HUMANEN ZELLINIE BJAB.B95.8.6

DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES GRADES EINES DOKTORS
DER NATURWISSENSCHAFTEN

DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE
DER EBERHARD-KARLS-UNIVERSITÄT TÜBINGEN

VORGELEGT VON
BÄRBEL SPRING GEB. MAIER
AUS ENINGEN u.A.

1984

Tag der mündlichen Prüfung 8. 1984

Dekan	Prof. Dr. E. Kulzer
1. Berichterstatter	Prof. Dr. V. Braun
2. Berichterstatter	Prof. Dr. W. Bessler

Die vorliegende Arbeit wurde im Laboratorium von Herrn Dr. A. Ziegler an der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen, Abt. II, Prof. DR. H. D. Waller durchgeführt dem ich für die wissenschaftliche Anleitung bei der Planung und Durchführung der Experimente danke.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. P. Wernet für die gute Beratung und Unterstützung während der Durchführung der Arbeit.

Für die Betreuung danke ich Herrn Prof. Dr. V. Braun.

Danken möchte ich auch Frau Dr. C. Müller für die Kooperation bei der HLA-Typisierung, Herrn Dr. G. Pawelec für die Durchführung der SB-Typisierung, Frau Dr. M. Schneider für Ihre immerwährende Diskussionsbereitschaft, Frau Prof. Dr. C. Fonatsch für die geduldige Einführung in das Gebiet der Zytogenetik, Herrn Dr. J. Kömpf für die Untersuchungen der Enzymaktivität von GLO, Frau G. Renz für die gute technische Unterstützung, Herrn M. Blaurock für die Hilfestellung bei der Auswertung der Daten, wie allen Ungenannten, die durch Diskussion und anregende Ideen zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Der Haupthistokompatibilitätskomplex	1
1.2.	HLA-Mutanten und ihre Bedeutung	9
1.3.	Monoklonale Antikörper und ihre Bedeutung	11
1.4.	Ziele dieser Arbeit	13
2.	Material und Methoden	14
2.1.	Material	14
2.1.1.	Tiere	14
2.1.2.	Zellinien	14
2.1.3.	Monoklonale Antikörper	16
2.1.4.	Antiseren	17
2.1.5.	Komplement	18
2.1.6.	Bakterien	18
2.1.7.	Zubehör für Zellkultivierung	18
2.1.8.	Nährlösungen	19
2.1.8.1.	Zellkulturmedium	19
2.1.8.2.	HAT-Selektionsmedium	19
2.1.8.3.	HT-Medium	19
2.1.8.4.	Einfriermedium	20
2.1.8.5.	Inkorporationsmedium	20
2.1.9.	Puffer und Chemikalienlösungen	20
2.1.1o.	Radiochemikalien	21
2.2.	Methoden	21
2.2.1.	Kultivierung der Zellen	22
2.2.2.	Klonierung und Reklonierung von Zellinien	22
2.2.3.	Präparation von Milz und Makrophagen sowie Aszites von Mäusen	22
2.2.4.	Bestrahlung von humanen Zellen	23
2.2.5.	Selektion von Mutanten mittels Antikörpern und Komplement	23
2.2.6.	Immunisierung von Mäusen	24
2.2.7.	Fusion von Zellen	24
2.2.8.	Einfrieren und Auftauen von Zellen	26

2.2.9. Bakterieller Bindungstest 27
2.2.10. Mikrozytotoxizitätstest 28
2.2.11. SB-Typisierung 28
2.2.12. Karyotypenanalyse 29
2.2.13. Glyoxalase I Bestimmung 30
2.2.14. Quantitative Bindungstests 30
2.2.15. Radioaktiver Bindungstest 31
2.2.16. Radiosktive Markierung von Zellen 32
2.2.17. Immunpräzipi tation des Antigen-Antikörperkomplexes 33
2.2.18. Radioaktive Markierung monoklonaler Antikörper 34
2.2.19. Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE) 34
2.2.19.1. SDS-PAGE 34
2.2.19.2. SDS-PAGE nach Lämmli 35
2.2.19.3. Isoelektrophokussierung (IEF) 35
3. Ergebnisse 37
3.1. Herstellung von HLA-Mutanten 37
3.1.1. Klonierung einer humanen Zellinie 37
3.1.2. Ermittlung der optimalen Bestrahlungsdosis 37
3.1.3. Prüfung des Komplemets hinsichtlich unspezifischer zytotoxischer Eigenschaften 41
3.1.4. Selektion von Zellen mit zytotoxischen Antikörpern und Komplement 41
3.2. Charakterisierung der Mutanten 44
3.2.1. HLA-Antigenexpression von Wildtypzellen und Mutanten im direkten bakteriellen Bindungstest 44
3.2.2. Quantitative Studien zur HLA-Antigenexpression 48
3.3.3. Typisi erung der Mutanten im Mikrozxtotoxizitätstest 51
3.2.3.1. Mikrozytotoxizitätstest mit Klasse I spezifischen monoklonalen Antikörpern 51
3.2.3.2. Mikrozytotoxizitätstest unter Verwendung von Alloantiseren 53
3.2.4. Typisierung der SB-Antigene 55
3.2.5. Zytogenetische Untersuchungen der Zellen 57
3.2.6. Untersuchungen des Glyoxalase-Enzyms 59

3.3. Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen HLA-Antigene unter Verwendung der Wildtyplinie und zweier Mutanten. 60
3.3.1. Herstellung monoklonaler Antikörper 60
3.3.2. Charakterisierung der monoklonalen Antikörper 61
3.3.2.1. Bestimmung der Immunglobulinklassen von TÜ160 und TÜ161 65
3.3.2.2. Biochemische Einsetzbarkeit der Antikörper bei Immunpräzipitationen 66
3.4. Biochemische Charakterisierung von BJAB.B95.8.6 und BM2.2 Zellen mit dem monoklonalen Antikörper TÜ160 und TÜ161 als auch mit Reagenzien gegen Klasse II-Antigene 68
4. Diskussion 73
4.1. Herstellung von HLA-Mutanten 74
4.2. Charakterisierung der Mutanten 76
4.3. Verwendungsmöglichkeiten der Mutanten 82
5. Zusammenfassung 86
6. Literaturverzeichnis 88
7. Abkürzungen 109

1. Einleitung

1.1 Der Haupthistokompatibilitätskomplex des Menschen

Das Immunsystem, wie es in allen tierischen Organismen verwirklicht und bei Wirbeltieren besonders differenziert ausgebildet ist, reguliert Reaktionen gegen körperfremde Proteine. Dies setzt die Unterscheidungsmöglichkeit zwischen "körpereigenen" und "körperfremden" Strukturen voraus. Für die Abstoßung von allogenem und xenogenem Gewebe sind Glykoproteinstrukturen auf den Zellen verantwortlich (Transplantationsantigene oder Haupthistokompatibilitätsantigene), die vom Empfängerorganismus als "fremd" erkannt worden sind. Die Haupthistokompatibilitätsantigene werden auf allen kernhaltigen Zellen und auf Thrombozyten exprimiert. Beim Menschen sind die haupthistokompatibilitätsgene in einem Abschnitt des kurzen Armes des Chromosoms 6 lokalisiert (Francke und Pellegrino, 1977; Abb. 1). Die Antigene des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC = "major histocompatibility complex") des Menschen (HLA = "human leucocyte antigen") wurden zuerst auf Leukozyten, den Effektorzellen des Immunsystems nachgewiesen. Die HLA-Region zählt inzwischen zu einer der genetisch und funktionell "exponiertesten" Genregionen des Menschen. Bisher ist kein weiteres genetisch determiniertes Merkmalssystem bekannt, das einen solch ausgeprägten Polymorphismus bei zugleich übersichtlicherem formalgenetischen Modell aufweist. Daher eignet sich das HLA-System insbesondere zur Bearbeitung zahlreicher humangenetischer Fragestellungen wie Charakterisierung menschlicher Populationen, Untersuchung von Selektions- und Evolutionsmechanismen, Chromosomenkartierung und die Assoziation bestimmter Krankheiten mit bestimmten HLA-Antigenen.

Die bislang am besten untersuchten MHC-Regionen sind die des Menschen (HLA) und der Maus (H-2 Komplex). In beiden Spezies wurden homologe Gene identifiziert, deren Produkte sich anhand ihrer Funktion und Struktur in 3 Klassen einteilen lassen. Eine Übersicht über Entdeckung, Funktion und biologische Bedeutung der humanen Klasse I, II, III-Antigene sind im Folgenden zusammengestellt.

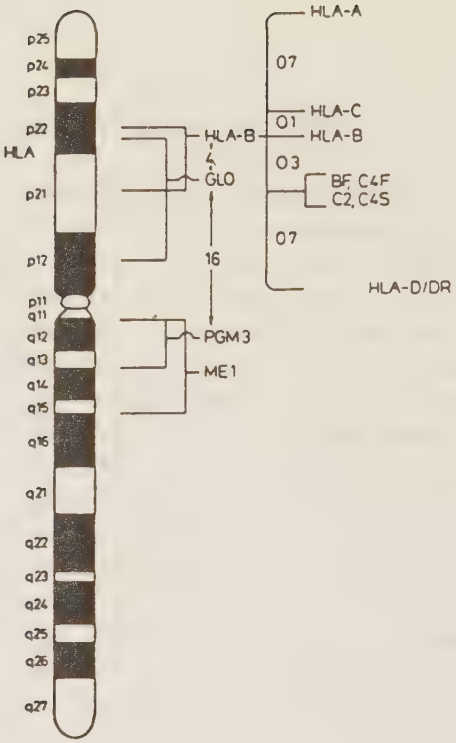


Abbildung 1 Gene und deren Lokalisation auf dem Chromosom 6 des Menschen nach Weitkamp und Lamm, (1982).
Die Gene des HLA-Komplexes sind auf dem kurzen (p) Arm des Chromosoms 6 lokalisiert. Zentromer dieser Gene liegt das GLO (Glyoxalase 1) Gen. Auf dem langen Arm (q) von Chromosom 6 befindeten sich die Gene für Phosphoglucomutase 3 (PGM3) und für des Malat Enzym (ME1).
Die Zahlen (rechts) geben die Rekombinationsfrequenz an.
HLA-A, B, C = Klasse I; HLA-D/DR = Klasse II;
BF, C2, C4F, C4S = Klasse III.

Das 1. HLA-Gen der späteren Klasse I-Antigene wurde von Dausset 1958 definiert. Er nannte es Mac und es entspricht dem heutigen HLA-A2. Diesem Befund ging die Beobachtung (Dausset, 1954) voraus, daß Seren polytransfundierter Personen Antikörper enthalten, die die weißen Blutzellen von bestimmten anderen Personen zu agglutinieren vermochten. Nachdem auch in Schwangerenseren solche Antikörper gefunden werden konnten (Rood et al., 1958 ; Payne und Rolfs, 1958) kam es rasch zum Nachweis eines weiteren Genproduktes, dem FOUR-Genprodukt (van Rood, 1962; mit den beiden Allelen 4a und 4b; heute: Bw4 und Bw6, die sog. "supertypischen Determinanten" von HLA-B), dem 2. Klasse I-Antigen des humanen MHC. Anhand von Familienanalysen (Dausset et al., 1965; Ceppellini et al., 1967) und ersten Rekonstruktionen nach "Crossing Over" Ereignissen innerhalb der Familiensegregation (Kissmeyer-Nielsen et al., 1969) konnte gezeigt werden, daß HLA-A und B Gene separate, jedoch eng gekoppelte Gene sind. Ein drittes Genprodukt der Klasse I (HLA-C) konnte durch Mayr und Mitarbeiter (1973) sowie Solheim und Thorsby (1973) ermittelt werden.

Die Genprodukte des HLA-Komplexes werden bevorzugt in Kopplungsgruppen vererbt, die jeweils die Hälfte des HLA-Genotyps repräsentieren und daher als Haplotypen bezeichnet werden. Die einheitliche Verteilung der Klasse I Antigene auf sämtlichen Gewebezellen eines Individuums läßt vermuten, daß sie die "Körperzugehörigkeit" (Allospezifität) einer jeden Zelle zu einem Organismus definieren. Tatsächlich konnte gezeigt werden, daß zytotoxische T-Lymphozyten nur dann virusinfizierte Zellen in einem Organismus zerstören können, wenn immunreaktive Lymphozyten und virusinfizierte Zielzellen gemeinsame HLA-A, B und/oder C Antigene tragen (Zinkernagel und Doherty, 1974); eine immunologische Voraussetzung, die als Restriktion bezeichnet wird.

Die Beobachtung, daß Lymphozytensuspensionen zweier nicht verwandter Personen in vitro gegeneinander proliferieren (Hirschhorn et al., 1963; Bain et al., 1964), führte zur Entwicklung des gemischten Lymphozytenkultur-Tests (MLC = "mixed lymphcyte culture"; Bach und Voynow, 1966), bei dem das Ausmaß der Proliferation durch 3-H-Thymidin-Einbau

quantifiziert werden konnte. Die MLC-Tests führten zum Nachweis der Klasse II Antigene, die enggekoppelt mit Klasse I Genen zunächst als MLC-Locus bezeichnet wurden (Kissmeyer-Nielsen et al., 1970; Mempel et al., 1972; 1973). Nur Klasse II verschiedene allogene Lymphozyten reagieren positiv in MLC-Tests. Einen ersten Schritt zur Vereinheitlichung der Typisierung haben Mempel und Mitarbeiter (1973) durch Verwendung von Stimmulatorzellen, welche dieselben MLC-Genprodukte auf beiden Haplotypen hatten ("homozygous typing cells), erreicht. Spender, die heterozygot für einen MLC-Locus waren, zeigten keine Blastentransformation mit der entsprechenden homozygoten Testzelle. Auf diese Weise konnten 12 verschiedene MLC-Determinanten charakterisiert werden, die als HLA-D Antigene beschrieben wurden. Mit der Beobachtung, daß Seren von Schwangeren teilweise die MLC-Reaktion hemmen, konnten MLC-Determinanten auch serologisch bestimmt werden (HLA-DR=D-related; Ceppellini et al., 1971; Wernet et al., 1975; Ceppellini und van Rood, 1974). Die Hypothese, daß es sich um ein einziges Gen HLA-DR/D handelt (Bodmer, 1978; Termijtelen et al., 1982), wurde durch serologische und biochemische Testergebnisse mehrerer Arbeitsgruppen bald in Frage gestellt (Park et al., 1978; Duquesnoy et al., 1979; Tosi et al., 1978; Tanagaki und Tosi, 1982; Shackelford et al., 1982). Das Ergebnis war ein Drei-Gen Modell: HLA-DR, HLA-DC (DC1=MT1=MB1; DC3=MB2) und HLA-BR (BR4=MT3; BR3=MT2). Bis heute ist allerdings noch fraglich, ob HLA-BR nicht doch nur supertypische Determinanten auf HLA-DR und DC Molekülen identifiziert (Sorrentino et al., 1983). Über die PLT-Technik ("primed lymphocyte typing"), in der T-Lymphozyten in einer gemischten Lymphozytenkultur sensibilisiert und in einer zweiten Reaktion als Typisierungszellen eingesetzt werden (Sheehy et al., 1975; Fradelizi und Dausset, 1975), gelang es einigen Arbeitsgruppen (Mawas et al., 1978; Shaw et al., 1980; Kavathas et al., 1981; Termijtelen et al., 1982) einen weiteren Locus der Klasse II Gene (HLA-SB) nachzuweisen.

Klasse II Antigene fungieren als Restriktionselemente in der Kooperation verschiedener Lymphozytenpopulationen eines Organismus. So können zum Beispiel erst spezifische Antikörper sezerniert werden, wenn ein Antigen von autologen Makrophagen aufgenommen, an der Zellober-

fläche mit syngenen Klasse II Antigenen den T-Helferzellen präsentiert wird, diese durch den Kontakt stimmuliert werden und dadurch die B-Zellklone - die den Rezeptor für das entsprechende Antigen tragen - aktivieren. Parallel dazu werden T-Supressorzellen angeregt, die die Antikörperausschüttung wieder stoppen sollen. Derartige Zell-Zell Interaktionen scheinen nur möglich zu sein, wenn zwischen den Lymphozyten zumindest ein HLA-D identisches Antigen vorhanden ist und dieses relevant für die Reaktion gegen ein Antigen ist (Restriktion der Immunantwort; Uytdehoog et al., 1979; Germain und Benacerraf, 1981).

Um den HLA-Komplex nach heutiger Sicht vollständig darzustellen müssen noch die immunologisch bedeutsamen Gene (Klasse III) der klassischen und alternativen Komplementaktivierung erwähnt werden. Allen (1974) entdeckte eine enge Kopplung des Bf-Gens mit dem HLA-Bereich. Das Bf-Protein ist der Faktor B des Properdinsystems, welches als Proaktivator von C3 am Anfang des zweiten Aktivierungsweges des Komplementsystems steht (Rittner, 1975; Mauff et al., 1978). Mit C2 (Fu et al., 1974; Meo et al., 1976) und C4 (O'Neill et al., 1978) wurden weitere Gene für Komplement-Komponenten in der HLA-Region kartiert. Die Reihenfolge der Klasse III Gene wird heute wie folgt festgelegt: HLA-D, Bf, C4, C2, HLA-B (Olaisen et al., 1984).

Mit Hilfe biochemischer Methoden konnten verschiedene Klasse I und Klasse II Antigene von der Zellmembran isoliert und sequenziert werden. Die Struktur der Klasse I Antigene besteht aus zwei Polypeptidketten: einer sogenannten schweren Kette (MG=Molekulargewicht 44 000) und einer leichten Kette (MG 12 000; Nakamuro et al., 1973). Die schwere Kette wird von den HLA-Genen kodiert, während die nicht polymorphe leichte Kette (ß-2-Microglobulin = ß2m) von dem Gen auf Chromosom 15 algelesen wird (Goodfellow et al., 1975; Zeuthen et al., 1977). Der membran-exponierte schwere Kettenabschnitt (275 Aminosäuren = AS) ist in 3 gleich große Domänen gegliedert (α1 = 1-90 AS; α2 = 91-182 AS; α3 = 183-274 AS), wobei in der α1 und α2 Region in den Positionen 30-39 bzw. 65-80 und 105-116 bzw. 138-156 eine starke Variabilität der Aminosäuren vorherrscht (Abb. 2). Dieselben Regionen der schweren Kette sind auch in der Aminosäurensequenz bei der Maus variabel. Diese Bereiche müssen

folglich als die, den Polymorphismus charakterisierenden Zonen angesehen werden. Die Domänen α2 und α3 ähneln in ihrer Größe denen der Immunglobuline (Ferguson et al., 1979; Orr et al., 1979a, 1979b).

Abbildung 2 Schematische Darstellung eines HLA- A, B, bzw. C- Antigens nach Coligan et al.,(1981).
Jeder Punkt steht für eine Aminosäure, wobei die offenen Zirkel die Regionen markieren, in denen sich die einzelnen Antigene sowohl beim Menschen als auch bei der Maus besonders voneinander unterscheiden.
α1: Domäne 1; α2:Domäne 2; α3:Domäne 3; ß2M:Beta-2-Mikroglobulin.

Das ß2m-Molekül besteht aus 99 AS. Eine starke Homologie dieses ß2m-Moleküls und der nicht polymorphen ß Domäne (ca. 93 Immunoglobulin-Kettenabschnitt konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen demonstriert werden (Smithies und Poulik, 1972; Peterson et al., 1972; Orr et al., 1979a; Trägardh et al., 1979; Marchalonis et al., 1984; Abb. 3).

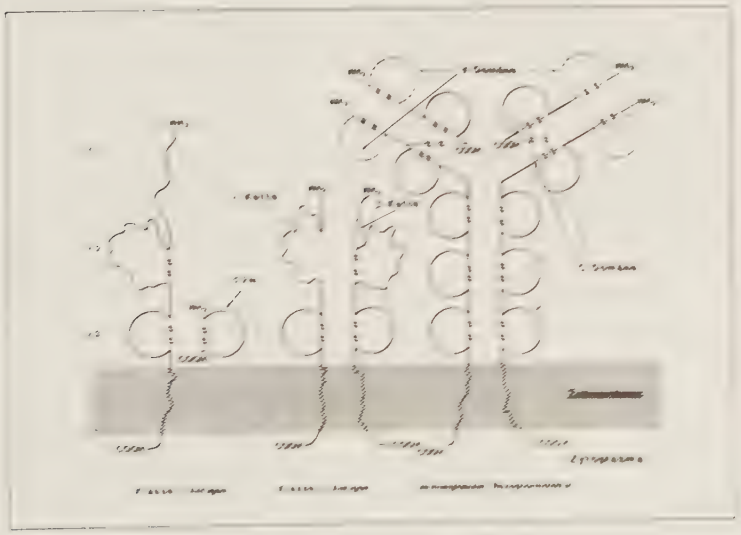


Abbildung 3 Schematische Darstellung einer Klasse I und II Antigens im Vergleich zu einem Immunglobulin-Rezeptormolekül in etwa natürlichen Größenrelationen nach Jensenius und Williams, 1982.

Die vom HLA-D Bereich kodierten Klasse II Antigene bestehen ebenfalls aus zwei Polypeptidketten: einer schweren α-Kette (MG etwa 34 000) und einer leichten β-Kette (MG etwa 29 000; Wernet, 1976; Snary et al., 1977). Nach mehreren kompletten Aminosäuresequenzanalysen von und β-Ketten (Kratzin et al., 1981; Yang et al., 1982), läßt sich die Situation folgendermaßen beschreiben: Beide Ketten bestehen aus 229 AS wobei die α-Kette einen zusätzlichen Kohlenhydratanteil besitzt. Der periphäre Teil der membranintegrierten Glykoproteine (198 AS) ist in je 2 Domänen (α1, β1: 1-99 AS und α2, β2: 100-198) gegliedert. Auch bei diesen Domänen von α2 und β2 können anhand ihres Aufbaus Parallelen zu den Domänen der Immunglobuline der konstanten Region als auch zu der 3 Domäne und dem ß2m-Molekül der Klasse I Antigene gezogen werden (Abb.3). Bis heute wurden mindestens vier verschiedene α-Ketten und sieben verschiedene β-Ketten, die mehr oder minder polymorph sind, als Translationsprodukte von Klasse II Genen identifiziert (Kaufmann et al., 1984).

Kopplungsanalysen und Zellhybridisierungen zeigten, daß der MHC des Menschen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 lokalisiert ist (Francke und Pellegrino, 1977). Klinische Daten partieller Trisonomie in Chromosom 6 konnten die HLA-Gene auf einen Abschnitt von 6p21-6p22 eingrenzen (Ferrando et al., 1980). Heute wird als Ort der HLA-Gene auf dem Chromosom 6 die Bande 6p21 möglicherweise sogar 6p21.3 diskutiert (Robson und Lamm 1984). Zentromer der HLA-Region in den Banden 6p21.3-6p21.2 liegt das GLO (Glyoxalase 1)-Gen (Gladstone et al., 1982). Das GLO-Enzym wird von diesem Gen kodiert und katalysiert zusammen mit dem Enzym Glyoxalase II und Glutathion Ketoaldehyde zu Hydroxysäuren (Kömpf et al.,1975). Distal des HLA-Bereiches (6p23-6p25) konnte das Gen für den Gerinnungsfaktor XIIIA (FA13) gefunden werden (Olaison et al., 1984a).

Anhand neuerer Untersuchungen der Gene des HLA-Komplexes durch "Southern-blotting"-Techniken konnte Trowsdale und Mitarbeiter, (1983) mit DR -Proben vier homologe Sequenzen ermitteln von denen er drei identifizieren konnte, nämlich DR , DC und SB . Analog dazu konnten sieben verschiedene β-Ketten (Krazin et al., 1981), die alle innerhalb

der HLA Region lagen, gefunden werden. Dies bedeutet, daß beide Polypeptidketten der Klasse II Antigene von Genen der HLA-Region kodiert werden müssen (Trownsdale et al., 1983).

Nach den neuesten Daten, die im Mai dieses Jahres in Wien (Histocompatibility-Testing) vorgetragen wurden, wird die Organisation von Klasse I, II und III-Genen vom Zentromer nach Außen auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 wie folgt angenommen: Zentromer- (SBß2, SBα2, SBß1, SBα1)- (DCα2, DCß2, DCα1,DCß1)- (DRß1, DRß2, DRß3, DRα1)- (C2-Bf-C4)- (B, C, A).

1.2. HLA-Mutanten und ihre Bedeutung

Auf der Suche nach geeigneten Objekten für das Studium des MHC's gelang es den Arbeitsgruppen von Pious und DeMars, humane EBV-transformierte Zellen mit unterschiedlichen Mutationen im HLA-Bereich zu etablieren. Solche Zellen, die von derselben Zellinie abstammen, sich aber in ihrem HLA-Phänotyp und ihrem Genotyp voneinander unterscheiden, sind zu wichtigen "Werkzeugen" für weiterführende immunologische und biochemische Untersuchungen über die Struktur und Funktion des MHC geworden.

Die ersten spontan auftretenden Mutanten der humanen Linie 8866 wurde von Pious und Mitarbeitern, (1973) sowie Pious und Sonderland, (1974) beschrieben. In späteren Arbeiten wurde gezielt auch durch chemische Mutagene und ionisierende Strahlung Mutationen in Zellpopulationen erzeugt (Pious et al., 1977b; Kavathas et al., 1980). Die Isolierung von im HLA-Bereich mutierten Zellen erfolgte über den zytotoxischen Test unter Verwendung von HLA-spezifischen Alloseren oder monoklonalen Antikörpern und Komplement. Nur jene Zellen, die für das selektionierte Antigen negativ waren, konnten nicht lysiert werden. Auf diese Weise konnte eine ganze Reihe von Mutanten der humanen Linie LCL-721 (Kavathas et al., 1980, 1981; Orr und DeMars 1983a,b,) und T5-1 (Pious et al., 1977a; Erlich et al., 1983) mit den unterschiedlichsten Veränderungen (Punktmutationen, Deletionen, Haplotypenverlust)

etabliert werden. Durch den Einsatz von Mutanten, die teilweise noch HLA-SB Moleküle exprimierten, jedoch die Antigene von HLA-A, B, C und DR eines Haplotypen vollständig verloren hatten, konnte bestätigt werden, daß HLA-SB in Kopplung mit den HLA-Genen steht und das SB Antigen von einem separaten Loci transkribiert wird, der zwischen HLA-DR und GLO liegen mußte (Kavathas et al., 1981). Ferner konnten DeMars und Mitarbeiter, (1983a) im Microzytotoxizitätstest mit Alloseren anhand der Reaktion von HLA-DR "Null"-Mutanten demonstrieren, daß die Alloantigene von HLA-DR und MT1/MB1 unter getrennter genetischer Kontrolle stehen. Durch Hybridisierungsversuche von isolierter DNS aus LCL-721 Zellen und Mutanten mit cDNS-Proben, die mit spezifisch HLA-Klasse I Loci hybridisierten, konnten Orr und DeMars, (1983a) weitere Klasse I ähnliche Gene, die telomer dem HLA-A2 Locus liegen, nachweisen. Vermutlich sind diese Gene den Tla und Qa-Genen (Yokayama et al., 1981; Soloski et al., 1982) im H-2 Komplex der Maus vergleichbar. Erlich und Mitarbeiter, (1983) war es gelungen , durch den Vergleich von chromosomalem Material einer T5-1 Zelle und einer Mutante- mit einer Deletion im kurzen Arm des Chromosoms 6- das Gen, welches für die HLA-DRα Kette kodiert, auf dem Chromosom 6 den Banden 6p21.0-6p23 zuzuordnen.

Diese wenigen Beispiele der Anwendung von Mutanten lassen bereits erkennen, welche enormen Möglichkeiten sich durch die gezielte Herstellung von HLA-veränderten Zellen bei der Erforschung des HLA-Komplexes bieten. Aber nicht nur für das Studium der Organisation und Funktion des HLA- Komplexes sind Mutanten einsetzbar. Sie können auch als Testzellen für die Charakterisierung monoklonaler Antikörper dienen (Shaw et al., 1984). Ferner ist es auch möglich, daß Mutanten, die sich untereinander oder zur Ausgangslinie in der Expression der Antigene mehr oder minder unterscheiden, als Immunogen für die Herstellung allospezifischer monoklonaler Antikörper und deren Charakterisierung eingesetzt werden.

1.3 Monoklonale Antikörper und ihre Bedeutung

Zur Testung der HLA-Antigene werden seit Jahren Antiseren von schwangeren Frauen, multitransfundierten und im speziellen Fall auch freiwillig immunisierten Personen eingesetzt. Es gibt jedoch verschiedene Gründe, die die Verwendbarkeit solcher Alloseren in der Routinediagnostik einschränken bzw. erschweren. 1) Abhängig vom jeweiligen momentanen Zustand des Immunsystems eines Individuums, kann der Titer der Antikörper in einem Serum, das zu verschiedenen Zeiten abgenommen wurde, stark variieren. Dies bedeutet, es muß immer eine erneute Überprüfung der Seren nach einer Neuabnahme erfolgenen, was einen enormen Material und Zeitaufwand darstellt. 2) Das Serum setzt sich aus heterogenen Antikörpern (bezogen auf die Immunglobulinklasse) zusammen. 3) Nur wenige Seren enthalten Antikörper, die ausschließlich monospezifisch für antigene Determinanten sind. Alloseren reagieren überwiegend mit mehreren Antigendeterminanten verschiedenster Allele (Beispiele für Kreuzreaktionen: HLA-A2, A28 oder HLA-B8, B14; Mayr et al., 1971). Abhilfe erhoffte man sich daher von der gezielten Herstellung monoklonaler Antikörper mit Spezifität für HLA- Alloantigene. Die Methode der Fusion von Lymphozyten immunisierter Tiere mit Myelomzellen, die zur Etablierung von antikörpersezernierenden Hybridzellen führte, wurde erstmals 1975 von Köhler und Milstein beschrieben. Die in Gewebekultur wachsenden Hybridzellinien waren in der Lage, Antikörper mit verschiedenster Spezifität in Abhängigkeit vom ursprünglich verwendeten Immunogen zu produzieren. Sowohl der hohe Reinheitsgrad und die Einheitlichkeit der Antikörper in Bezug auf Spezifität und Ig-Klasse , die Möglichkeit, die Hybridzellen in flüssigem Stickstoff einzufrieren und somit über Jahrzehnte aufzubewahren, als auch die Herstellung der Reagenzien in nahezu unbegrenzter Menge, bildeten enorme Vorteile gegenüber Alloseren.

Der erste charakterisierte monoklonale Antikörper gegen nicht polymorphe Derterminanten von HLA-A, B, C-Glykoproteinketten war W6/32.HL. Er wurde in zusammenarbeit mit C. Milstein und A. Williams von Barnstable und Mitarbeitern, (1978) hergestellt. Ein Jahr später

gelang es der Arbeitsgruppe um Brodsky, (1979) monoklonale Antikörper gegen ß2m-Determinanten zu etablieren. Sehr schnell wurde erkannt, daß die Verwendung der gesamten Zellmembran als Immunogen im xenogenen System primär zu monoklonalen Antikörpern führt, die nicht polymorphe Determinanten erkennen. Immunisierte man hingenen Mäuse mehrmals mit einer erheblichen Menge gereinigter Membranproteinen, konnten auch Antikörper isoliert werden, die polymorphe Determinanten erkennen (Parham und Bodmer, 1978). Trotz der verschiedensten Immunisierungeschemata und der Aufarbeitung der Immunogene ist die Wahrscheinlichkeit, einen Alloantikörper zu bekommen nicht sehr hoch.

Dennoch konnte bisher eine große Anzahl von monoklonalen Antikörpern gegen die verschiedensten Determinanten von HLA-Antigenen hergestellt werde. Mit diesen Reagenzien ist es möglich, eine bessere Definierung von HLA-A, B, und C Spezifitäten vorzunehmen, die mit Alloseren sehr komplexe Kreuzreaktionen zeigen (z.B. HLA-A2 , A28; Mayr et al., 1971). So konnten mit monoklonalen Antikörpern (spezifisch gegen HLA-A2 und/oder A28 Antigene) diese Moleküle exakt voneinender differenziert werden. Die Aminosäuresequenzierung der schweren Ketten ergab, daß sich die beiden Glykoproteine lediglich in 10 Aminosäuren unterschieden (Lopez de Castro et al., 1982). Aber auch bei der Prüfung der Expression bestimmter Antigene (Klassifizierung von Leukämien und Lymphomen; Knapp,1981) an Geweben und Tumorzellen, bei der gezielten Isolation von Antigenen zur Sequenzierung der Aminosäuren, bei der Charakterisierung von in vitro Translationsprodukten isolierter "Messenger-RNS" (Ploegh et al., 1979), bei der Erforschung der Evolution von Antigendeterminanten (Brodsky und Parham, 1982), sowie für funktionelle Studien der HLA-Antigene sind monoklonale Antikörper essentiell. Diese vielseitige Verwendbarkeit solcher Reagenzien zeigt, wie sinnvoll es ist, die Palette von monoklonalen Antikörpern gegen HLA-Antigene stetig zu erweitern.

1.4 Ziele dieser Arbeit

Das Hauptziel der hier vorliegenden Arbeit war die Etablierung von Zellen einer humanen Linie, die in ihrer Antigenexpression von der Ausgangslinie abweichen. Hierfür sollten die gewählten Ausgangszellen zur Erhöhung der Mutationsrate mit Gammastrahlen behandelt werden. HLA-Mutanten sollten durch "Negativselektion" mit monoklonalen Antikörpern und Komplement isoliert werden. Als Ergebnis wurden Zellen erwartet, die sich sowohl in ihrem Phänotyp als auch in ihrem Genotyp von der Ausgangslinie unterscheiden und somit eine genauere Lokalisierung der HLA-Gene und der Reihenfolge von MB/MT zu DR ermöglichen sollten. Ferner wurden Aussagen über quantitative Studien der Antigenexpression im Hinblick auf Regulationsmechanismen, sowie die Isolierung von HLA-Antigenen für vergleichende Studien mit anderen Zellantigenen erwartet. Letztlich durften mit Hilfe derartiger Mutanten auch Fortschritte bei der Herstellung und Austestung monoklonaler Antikörper gegen Alloantigene erhofft werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Tiere

Zur Gewinnung von Aszitesflüssigkeit, Makrophagen, Milzzellen und auch für Immunisierungszwecke wurden 3 Monate alte Mäuse vom Stamm BALB/c (Zentrales Institut für Versuchstiere, Hannover) verwendet.

2.1.2 Zellinien

Für die Untersuchungen in dieser Arbeit wurden die in Tabelle 1 aufgeführten humanen B, T und "Null" Zellinien, sowie eine Maus-Myelomlinie (P3-NSI)1-Ag4-1 (NS1) zur Zellfusion (Köhler et al., 1976) verwendet.

BL = Burkitt's Lymphom;
EBV = Epstein-Barr-Virus;
LB = B-Lymphom;
B-ALL= akute lymphoplastische Leukämie vom B-Zelltyp;
NB = normale EBV-transformierte B-Zellinie;
T-ALL= akute lymphoblastische Leukämie vom T-Zelltyp;
ALL = non-T, non-B akute lymphoblastische Leukämie;
AUL = akute undifferenzierte Leukämie
AML = akute myeloische Leukämie;
APL = akute promyelozytäre Leukämie;
MS = Chloracetat Esterase-positives Myelosarkom;
CML = chronische myeloische Leukämie.

Tabelle 1 Aufstellung aller humanen Zellinien, die in den Versuchen verwendet wurden.

Name	Abstammung	Referenz
Daudi	BL	Klein et al., 1968
Namalwa	BL	Reedman und Klein, 1973
NC-37	BL	Rymo et al., 1981
EB-3	BL	Epstein et al., 1965
BJAB	BL	Menezes et al., 1975
BJAB-HR1K	EBV-superin-	Fresen und zur Hausen, 1976
BJAB.B95.8	fizierte BJAB	Klein et al., 1976
ERL	LB	Rosenfelder et al., 1982
BRW	frühe-B-ALL	Rosenfelder et al., 1982
Bri-8	NB	Snary et al., 1974
KR3598	NB	Heinrichs et al.,1980
H2LCL	NB	Heinrichs et el., 1980
Priess	NB	Baron et al., 1979
SHOO	NB	Rosenfelder et al., 1982
8677	NB	wurden von Frau Dr.C.
1788	NB	Müller zur Verfügung
BOB	NB	gestellt
MS8482	NB	Müller et al., 1982
MOLT-4	T-ALL	Minowada et al., 1972
CCRF-CEM	T-ALL	Foley et al., 1965
JMN	T-ALL	Müller et al., 1983a
1301	T-ALL	Adams et al., 1970
RH	ALL	Müller et al., 1983b
KM-3	ALL	Schneider et al., 1977
Reh	ALL	Rosenfelder et al., 1977
RH	AUL	Müller et al., 1983b
ML-1	AML	Minowada, 1981
HL-60	APL	Gallagher et al., 1979
U937	MS	Sundström und Nilsson, 1976

2.1.3 Monoklonale Antikörper

Alle monoklonalen Antikörper mit der Bezeichnung TÜ wurden im Immunologischen Labor der Medizinischen Klinik von Tübinger hergestellt. Für alle Experimente wurden Kulturüberstände antikörperproduzierender Myelomhybride verwendet. Ausnahmen, in denen mit Aszites gearbeitet wurde, sind im Text vermerkt. Ein Überblick über die Antigenspezifität, die Immunglobulinklasse sowie die Bezeichnung und Referenz aller in dieser Arbeit verwendeten monoklonalen Antikörper wird in Tabelle 2 gegeben.

Tabelle 2 Liste aller monoklonalen Antikörper, die für die Herstellung und Phänotypisierung von menschlichen Zellinien eingesetzt wurden.

Bezeichnung	Antigenspezifität	Ig-Klasse	Referenz
W6/32.HL	HLA-A, B, C schwere Ketten	Maus IgG	Barnstable et al., 1978
W6/32.HK	inaktive Variante	Maus IgG	Ziegler und Milstein, 1979
TÜ25	Epithelantigen	Maus IgM	Ziegler et al., 1981
Tü99	ß2-Mikroglobulin	Maus IgM	Shi et al., unveröffentlichte
TÜ100	ß2-Mikroglobulin	Maus IgM	Shi et al., Ergebnisse
4B	HLA-A2, A28	Maus IgG	Yang et al., 1984
TÜ101	HLA-A2, A28	Maus IgM	Müller et al., 1983a
A28,2M1	HLA-A2, A28	Maus IgG.	Grumet et al., im Druck
FMC 5	HLA-A2, A28	Maus IgA	Beckmann et al., 1981
XV-17.1	HLA-A2, A28	Maus IgG	Bourel et al., 1984 im Druck
TÜ109	HLA-Bw4	Maus IgG	Müller et al., in Arbeitung
TÜ48	HLA-Aw23, Aw24, Aw32, Bw4	Maus IgM	Müller et al., 1982

Fortsetzung von Tabelle 2

Bezeichnung	Antigenspezifität	Ig-Klasse	Referenz
SFR8-B6	HLA-Bw6	RatteIgG	Radka et al., 1982
TÜ110	HLA-B13	Maus IgG	Müller et al., 1983b
TÜ22	HLA-MB (DC)	Maus IgG	Ziegler et al., 1982
Tü34	HLA-DR	Maus IgG	Ziegler et el., 1984
TÜ35	HLA-DR, SB	Maus IgG	Ziegler et al., 1984
TÜ36	HLA-DR	Maus IgG	Ziegler et al., 1984
Tü37	HLA-DR, SB	Maus IgG	Ziegler et al., 1984
TÜ39	HLA-DR, SB	Maus IgG	Ziegler et al., 1984
TÜ43	HLA-DR, SB	Maus IgG	Ziegler et al., 1984
YD/63.HLK	HLA-DR, SB	RatteIgG	Ziegler et al., 1984
SFR3-DR5	HLA-DR5	RatteIgG	wurde uns freundlicherweise von Dr.S.Radka überlassen
NDS 15.38	HLA-DR2	Maus IgG	Fuggle, S., 1984
7.3.19.1	HLA-MT2	Maus IgG	Koning et al.,1984
BT3/4	HLA-DC1	Maus IgG	Corte et al., 1981
VD12	HLA-MB3	Maus IgG	Giles et al., 1983

2.1.4. Antiseren

Es wurden nur affinitätschromatographisch gereinigte Antikörper verwendet: Ziege anti-Maus IgG (spezifisch für γ und leichte Ketten), Ziege anti-Maus IgM (spezifisch für μ- Ketten) wurden von der Fa. Medac, Hamburg bezogen, Kaninchen anti-Ratte IgG (spezifisch für γ und leichte Ketten) von Conco, Wiesbaden. Alle Antikörperpräparationen wurden in einer Konzentration von 100 μg/ml in Hanks Balanced Salt Solution mit 0,1% Natriumazid bei -20°C aufbewahrt. Die gegen IgG der Ratte gerichteten Antikörper wurden vor Benutzung noch an der Zellinie

BJAB.B95.8.6 absorbiert um unspezifische Reaktionen zu eliminieren (es wurden 400 µg Antikörper in 400 µl HBSS/Az mit 1x10*7 Zellen gemischt, 30 min bei 4°C inkubiert und nach Zentrifugation: 10 min, 1 000 UpM der Überstand abgemommen).

2.1.5 Komplement

Das Komplement wurde freundlicherweise von Frau Dr. C. Müller zur Verfügung gestellt. Nach Absorbierung des Komplements an BJAB.B95.8.6 Zellen (6x10*8 Zellen auf 10 ml Komplement, 30 min, 0°C, Zentrifugation 10 min, 1 000 UpM) wurden kleine Portionen von 2-5 ml bei -70°C eingefroren.

2.1.6 Bakterien

Für den bakteriellen Bindungstest und für Immunpräzipitationen wurde eine 10%ige Bakteriensuspension von Staphylococcus aureus Stamm Cowan A (hitzeinaktiviert und Formaldehyd-fixiert) der Fa. Calbiochem-Behring, La Jolla, USA, eingesetzt.

2.1.7 Zubehör für Zellkultivierung

Alle humanen Zellen und Myelomhybride wurden entweder in Platten mit verschieden großen Schalen (Platte mit 24-Schalen, Durchmesser 16 mm und Platten mit 96-Schalen, Durchmesser 7 mm, Fa. Tecnomara, Hüttenberg) oder in Kulturflaschen mit 50 ml, 250 ml und 650 ml Fassungsvermögen (Fa. Corning, Wiesbaden) kultiviert. Für die Zentrifugation von Zellen wurden sterile konische Polystyrol Röhrchen mit 15 ml und 50 ml Volumen (Fa. Falcon, Heidelberg) benutzt. Die Homogenisierung von Milzgewebe erfolgte in Polystyrol Röhrchen mit Rundboden und 10 ml Fassungsvermögen (Ra. Greiner Nürtingen). Zum

Einfrieren der Zellen wurden sterile 2 ml-Polypropylen Röhrchen (Fa. Greiner, Nürtingen) mit Schraubverschluß verwendet.

2.1.8 Nährlösungen

2.1.8.1 Zellkulturmedium

"Eagle's minimal essential medium", nach Dulbecco modifiziert (DMEM), wurde mit D-Glucose (4,5 g/l) , L-Glutamin (2 mM), (Fa. Böhringer, Mannheim), Streptomycin (100 µg/ml), Penicillin 100 IE/ml (Fa. Seromed, München) und 20, 10 oder 5% fötales Kälberserum (FCS; Fa. Conco, Wiesbaden oder Fa. Medac, Hamburg) versetzt.

2.1.8.2 HAT-Selektionsmedium (Littelfield, 1964)

Hypoxanthin (136,1 mg) und Thymidin (38,75 mg) wurden in 100 ml A. dest. unter Wärmezufuhr aufgelöst. Zu 50 ml dieser Stammlösung wurden noch 5ml Aminopterin (176 mg/100 ml in 0,008 M NaOH) und 45 ml DMEM gegeben. Aus dieser 50-fach konzentrierten Stammlösung wurden 10 ml zu 500 ml fertigem DMEM/FCS vor der Verwendung gegeben.

2.1.8.3 HT-Medium

5 ml Hypoxanthin-Thymidin Stammlösung wurden vor Gebrauch mit 500 ml fertigem DMEM/FCS gemischt.

2.1.8.4 Einfriermedium

Das Einfriermedium setzte sich aus 900 ml fötalem Kälberserum und 100 ml Dimethylsulfoxid (DMSO; Fa. Merck, Darmstadt) zusammen. Bis zum Gebrauch wurde es in kleinen Mengen bei -20°C gelagert.

2.1.8.5 Inkorporationsmedium

Das Inkorporationsmedium wurde wie bei Pink und Ziegler, (1979) beschrieben hergestellt. Essentielle und nicht essentielle Aminosäuren ohne Lysin oder Methionin, Vitamine, Glutamin, Antibiotika, dialysiertes FCS, radioaktives Lysin oder Methionin, 10-fach konzentriertes HBSS (Fa. Gibco, Glasgow, UK) und A.bidest waren die einzelnen Bestandteile des Mediums.

2.1.9 Puffer und Chemikalienlösungen

Als Waschpuffer für bakterielle und quantitative Bindungstests diente Hanks Balanced Salt Solution ph 7,3 (HBSS) mit 0,1% (w/v) Natriumazid (HBSS/Az) oder mit zusätzlich 0,1% (w/v) Rinderserumalbumin (HBSS/Az/BSA).

Zum Fixieren und Färben von Zytofugenpräparaten wurde 95% (v/v) Methanol, May Grünwald und Gimsa Färbelösung sowie ein 0,2M KH_2PO_4, 0,2M NaOH Puffer pH 6,8 benötigt. Die Gimsalösung wurde zum Gebrauch 1:10 mit dem Puffer versetzt.

Die Fixierung von Gelen erfolgte in 25% Äthanol, 10% Eisessig und 65% A. dest.

Die radioaktiv markierten Zellen wurden in HBSS/Az mit 0,5%NP40 und 1mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) lysiert.

Für den radioaktiven Bindungstest wurde eine Lösung aus HBSS mit 10%FCS, 20mM Hepes(N-(2-Hydroxyäthyl)piperazin-N'-2-äthansulfonsäure und 0,1% (w/v) Natriumazid verwendet.

Der Szintillationscocktail für den Flüssig-Szintillationszähler bestand aus 0,5% (w/v) Diphenyloxazole (PPO), 0,02% (w/v) p-Bis-(2-(5-phenyloxazolyl))-benzen (POPOP)und 54% (w/v) Triton X-100 in Toluol.

Die Sodiumzitratsalzlösung (2xSSC) für die Chromosomenpräparation bestand aus 22,05g tri-Na-citrat-2-hydrat, 13,83 g NaCl und wurde mit A.dest auf 2,5 L aufgefüllt.

Der Puffer zum Überschichten der Proben bei der Isoelektrischen Fokusierung (IEF) setzte sich aus 7,5 g Harnstoff und 1% Ampholine-Mischung (200 µl pH 5-7; 50 µl pH 3,5-10) in 25 ml A.dest zusammen. Das Gel bestand aus 11g Harnstoff, 4 ml NP40 (10%ig), 4ml Acrylamid+1,6%iges Bisacrylamid (30%ig), 4 ml A. dest, 1ml Ampholine-Mischung (1,5 ml pH 5-7; 1 ml pH 7-9; 0,2 ml pH 3,5-10). Der Probenpuffer setzte sich wie folgt zusammen: 14,2g Harnstoff, 5ml NP40 (10%ig), 1,25 Ampholine (pH 3,5-10), 1,25 ß-Mercaptoäthanol und wurde mit A. dest auf 25 ml aufgefüllt.

2.1.10 Radiochemikalien

Für die Inkorporation radioaktiven markierten Aminosäuren in Proteine wurde L-(4,5-3-H)-Lysin-monohydrochlorid mit einer spezifischen Aktivität von 2,78 TBq/mmol in einer Konzentration von 37 MBq/ml, L-(U-14C) Lysin Monohydrochlorid mit einer spezifischen Aktivität von 12,9 GBq/mmol in einer Konzentration von 1,85 MBq/ml und L-(35-S) Methionin mit einer spezifischen Aktivität von 54,9 TBq/mmol in einer Konzentration von 615,7 MBq/ml eingesetzt.
Die radioaktive Markierung von Zellen mit Na-125I sowie die Jodierung von Ziege-anti Maus IgG wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Ziegler durchgeführt.
Die Radiochemikalien wurden von der Fa. Amersham Buchler, Braunschweig bezogen.

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung der Zellen

Die Zellen wurden in DMEM/10%FCS mit einer Zelldichte von 1-2x10*5 Zellen/ml (Bestimmung in Neubauer Zählkammer) kultiviert. Lediglich bei der Gewinnung von antikörperhaltigen Kulturüberständen wurden die Zellen in DMEM mit 5%FCS und bis zu einer Dichte von 1x10*6 Zellen/ml angezogen. Kulturmedium mit 20% FCS-Anteil kam bei Klonierungen und Fusionen zur Anwendung. Die optische Begutachtung der Zellen erfolgte mit einem Leitz Umkehrmikroskop.

2.2.2 Klonierung und Reklonierung von Zellinien

Bei der Verwendung von Zellen in Tests oder bei ihrer Charakterisierung war es unerläßlich, mit einer homogenen Zellpopulation zu arbeiten. Dem Protokoll von Levy et al., (1979) folgend wurden die Klonierungen und Reklonierungen von Zellen durch limitierte Verdünnungen von Zellsuspensionen durchgeführt (Grenzverdünnung). Als Füllerzellen bei der Klonierung von BJAB.B95.8 Zellen oder deren Mutanten dienten Maus-Makrophagen (zuvor mit 20 Gy bestrahlt), die in einer Zellkonzentration von 1x10*4/Schale einer Platte mit 96 Schalen eingesetzt wurden. Klonierung und Reklonierungen von Hybridzellen erfolgten unter Zugabe von Milzzellen einer Balb/c Maus in der Konzentration von 5x10*4 Zellen/Schale.

2.2.3 Präparation von Milz und Makrophagen sowie Aszites aus Mäusen

Die Mäuse wurden mit Kohlendioxid getötet und nach Desinfektion in einer 70% igen Alkohollösung wurde die Bauchdecke geöffnet. Bei der Entnahme der Milz wurde das Peritoneum weit eröffnet, für die Makro-

phagengewinnung jedoch nur durchstochen, und der Bauchhöhlenraum mit 10 ml sterilem DMEM (sterilen Pasteurpipette) ausgespült.

Für die Gewinnung von Aszitesflüssigkeit wurden BALB/c Mäuse 14 Tage vor Versuchsbeginn mit 0,5 ml Pristan (Potter, 1972) gespritzt. Etwa 1x10*7 Hybridzellen konnten in die Bauchhöhle der Maus injiziert werden. Nach 10-14 Tagen war die Bauchhöhle der Maus mit ca. 5-10 ml Aszitesflüssigkeit angefüllt, die nach Tötung der Maus entnommen werden konnte. Die Blutgerinnung erfolgte bei 37°C im Wasserbad. Danach wurde 10 mi n bei 2 000 UpM zentrifugiert und das Serun als Überstand abgenommen.

2.2.4 Bestrahlung von humanen Zellen

Exponentiell wachsende Zellen der Zellinie BJAB.B95.8.6 wurden in einer Dichte von 2x10*5 Zellen/ml Kulturmedium jeweils unterschiedlichen Dosen von Gammastrahlen (1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; Gy ; Gammacell-1000, Atomic Energy of Canada, Ltd.) ausgesetzt. Die Sterberate der Zellen in Abhängigkeit von der Bestrahlungsintensität im Vergleich zu einem nicht bestrahlten Kontrollansatz konnte durch Bestimmung der Zellzahl ermittelt werden.

2.2.5 Selektion von Mutanten mittels Antikörpern und Komplement

1x10*7 BJAB.B95.8.6 Zellen, 5 Tage zuvor mit 3 Gy bestrahlt, wurden 2-mal mit je 10 ml sterilem HBSS gewaschen und das Zellsediment zuletzt in einer Antikörpermischung von TÜ48, TÜ101 und TÜ109 im Mischungsverhältnis 1:1:1 (2,5 ml Gesamtvolumen) resuspendiert. Die Inkubationszeit betrug 30 min bei 22°C unter kontinuierlicher Bewegung. Vor der Zugabe von 12,5 ml absorbiertem Komplement wurden die Zellen vom Antikörpergemisch durch Zentrifugation (5 min, 800 UpM) getrennt. Das Komplement verblieb 70 min bei 22°C unter leichtem Schütteln bei den Zellen. Die überlebenden Zellen wurden durch Zentrifugation (5 min 800

UpM) sedimentiert und konnten nun in DMEM/20%FCS aufgenommen und in 10 Kulturplatten (mit je 96-Schalen) zusammen mit 1x10*7 bestrahlten Maus-Makrophagen verteilt werden. Nach zwei wöchiger Inkubation bei 37° C und 5%-CO2-Begasung konnten wachsende Zellkolonien registriert und einige Tage später in 24-Schalen-Platten überführt werden. Alle 15 transferierten Zellinien wurden eingefroren, nachdem erste Hinweise vorlagen, daß es sich um Mutanten handelte. Sämtliche Linien wurden auch erfolgreich kloniert, so daß mit homogenen Populationen gearbeitet werden konnte.

2.2.6 Immunisierung von Mäusen

Eine BALB/c-Maus wurde zweimal in Abständen von 14 Tagen intraperitoneal und intramuskulär mit 1x10*7 BJAB.B95.8.6 Zellen ("Wildtyp"), und eine weitere Maus in einem zweiten Ansatz mit BM2.2 Zellen (der Mutanten) immunisiert. Drei Tage bevor die Milz entnommen wurde, erfolgte eine letzte Immunisierung mit der gleichen Zellmenge intravenös.

2.2.7 Fusion von Zellen

Die Fusion erfolgte in Anlehnung an Galfre et al. (1977). Die immunisierte Maus (vergl. 2.2.6) wurde getötet und nach Desinfektion mit Alkohol unter der sterilen Arbeitsbank die Milz entnommen (vergl. 2.2.3). Die Milz kam sofort in ein Polypropylenröhrcher. mit Rundboden, das ca. 4 ml kaltes DMEM ohne FCS enthielt. Mit einem Teflon Homogenisator wurde die Milz zerquetscht und nach Absinken der noch zu großen Stücke die Zellen im Überstand vorsichtig mit einer Pipette abgenommen. Es erfolgte eine nochmalige Homogenisierung der im Röhrchen verbliebenen Stücke. Nach Vereinigung aller Milzzellen wurden diese

abzentrifugiert (10 min, 1000 UpM) und anschließend ihre Anzahl bestimmt (Neubauer Zählkammer). Exponentiell wachsende NS1 Zellen wurden ebenfalls abzentrifugiert (10 min, 1000 UpM), in einer definierten Menge Medium aufgenommen und gezählt. 1x10*8 Milzzellen und 1x10*7 NS1 Zellen wurden in einem 50 ml Röhrchen gemeinsam sedimentiert (10 min, 1000 UpM), der Überstand vorsichtig entfernt und die Zellen nach kurzem Aufschütteln bei 37°C gehalten. Von 37°C erwärmtem PEG (Polyäthylenglycol: 50% (w/v) in DMEM), welches die Anlagerung der Zellen induziert, wurden 0,8 ml innerhalb einer Minute zu den vermischten Zellen gegeben, eine Minute weitergerührt und danach 1 ml 37°C warmes DMEM langsam zugefügt. Nochmals wurde 1 ml erwärmtes DMEM unter Rühren zugesetzt, und die restlichen 8 ml wurden dann innerhalb der nächsten 3 min zu den Zellen pipettiert. Zuletzt wurde das Fusionsgemisch auf 50 ml mit DMEM/20%FCS aufgefüllt.

Von nicht immunisierten Mäusen wurden ebenfalls Milzzellen- jedoch nur für den Gebrauch als Füllerzellen- präpariert und in zehn 24-Schalen Platten in einer Konzentration von 1x10*6 Zellen/Schale in 1,5 ml DMEM/20%FCS vorgelegt. Die Verteilung der Suspension, welche die fusionierten Zellen enthielt, wurde anschließend wie folgt vorgenommen: Schale 1-48 erhielt 50% der Fusionsmischung, Schale 49-96 erhielt 25%, Schale 97-144 12,5%, 145-192 6,25% und 193-240 noch 3,125%. Vom 2.-4. Tag wurde täglich 1 ml Medium aus jeder Schale abgesaugt und durch 1ml DMEM/20%FCS/HAT ersetzt (Selektion der nicht fusionierten Myelomzellen). Ansonsten wurde ein Austausch von Medium nur noch an den Tagen 5, 7 und 9 vorgenommen. Ab dem 10. Tag nach der Fusion konnten Zellkulturüberstände von relativ dicht gewachsenen (bis zu einem Drittel des Schalenbodens) Hybridkulturen auf Antikörperpräsenz im radioaktiven Bindungstest getestet werden.

Hybridzellen, die nach der ersten Austestung als potentielle Produzenten von interressanten HLA-Reagenzien anzusehen waren, wurden über mehrere Tage langsam an DMEM/20%FCS/HT Medium umgewöhnt und kloniert. Nach 5 Tagen konnten die ersten Klone in den einzelnen Schalen von 96iger Platten registriert werden. Aus den letzten beiden Reihen der Platte (Grenzverdünnung 0,2 Zellen/Schale) wurden nach

weiteren 10-12 Tagen jeweils 3-5 verschiedene Hybridüberstände abgenommen und im radioaktiven Bindungstest untersucht um sicherzustellen, daß die Hybridzellen weiterhin Antikörper produzierten. Aus Sicherheitsgründen (Kontamination, Verlust der Fähigkeit Antikörper zu bilden usw) wurden mindestens 2 Einfrierampullen mit je 5x10*5 Zellen vor der nachfolgenden Reklonierung der Zellen eingefroren. Die Kultivierung von reklonierten Hybriden erfolgte fernerhin ohne Zusatz von Hypoxanthin und Thymidin zum Medium.

2.2.8 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Sowohl alle humanen Zellinien als auch die Hybridzellen konnten in Einfriermedium resuspendiert, in flüssigem Stickstoff aufbewahrt und bei Gebrauch wieder rekultivert werden. Zum Einfrieren wurden die Zellen abzentrifugiert (10 min, 800 UpM) und je nach Anzahl (5x10*6-1x10*7) der Zellen in ca. 1 ml eiskaltem Einfriermedium (vergl. 2.1.8.4) aufgenommen, in sterile Einfrierröhrchen überführt und in einem geschlossenen Styroporbehälter 2 Tage lang bei -70°C belassen, bevor die Endlagerung in dem mit flüssigem Stickstoff gefüllten Tank erfolgte.

Beim Auftauen der Zellen wurden 15 ml Röhrchen mit 4°C kaltem DMEM/10%FCS vorbereitet. Die eingefrohrenen Ampullen kamen vom Stickstoff sofort in ein 37°C Wasserbad, bis sich die gefrorene Zellsuspension vom Gefäßrand gelöst hatte und somit in die mit Medium vorbereiteten Röhrchen gegeben werden konnte. Nach der Zentrifugation (7 min, 800 UpM) wurde das Medium abgesaugt und die Zellen nach Resuspendierung in 24-Schalen Platten verteilt. Die Platten enthielten DMEM mit verschiedene Konzentrationen an FCS, um den unterschiedlichen Bedürfnissen der verschiedenen Zellen nach dem Auftauen gerecht werden zu können.

2.2.9 Bakterieller Bindungstest

Die phänotypische Charakterisierung von HLA-Determinanten auf humanen Zellen mit monoklonalen Antikörpern, erfolgte mit dem "indirekten" (Ziegler et al., 1982) oder dem "direkten" bakterielle Bindungstest (Uchanska-Ziegler et al., 1982).

Je 1x10*5 gewaschene (2-mal mit HBSS/AZ) Zellen wurden in Mikrotiterplatten (96-Schalen, U-Form, Fa. Greiner, Nürtingen, FRG) 30 min lang bei 4°C mit monoklonalen Antikörpern (ca. 10 µl) inkubiert. Nach 3-maligem Waschen (HBSS/AZ) konnten dann je 5 µl einer 10%igen Bakteriensuspension zugesetzt werden. Die Bakterien waren zuvor mit Ziege-anti-Maus-IgG, Kaninchen-anti-Maus-IgM, oder Kaninchen-anti-Ratten-IgG beschichtet worden (100 µg spez. Antikörper in 1 ml wurden 30 min lang auf einem Rotationsmischer mit dem Sediment von 1ml 10%iger Bakteriensuspension inkubiert und danach 3-mal mit HBSS/AZ/BSA gewaschen. Die Bakterien resuspendierte man in soviel HBSS/AZ, daß die Ausgangskonzentration der Bakterien wieder 10% entsprach). Die Zellen wurden nach 30 min Inkubation mit den Bakterien bei 4°C 5-mal gewaschen und danach konnten Zytozentrifugenpräparate hergestellt werden (Cytospin 2, Fa. Shandon Southern Products Ltd., Cheshire, UK).

Beim direkten bakteriellen Bindungstest (Uchanska-Ziegler et al., 1982) wurden die zuvor mit anti-Maus Immunglobulinen inkubierten und anschließend gewaschenen Bakterien mit monoklonalen Antikörpern (100 µl 10% Bakteriensuspension + 900 µl Antikörpersuspension) für mindestens 1 h bei 4°C unter leichtem Bewegen inkubiert und nach 3-maligem Waschen mit HBSS/AZ/BSA sowie nach Einstellung der Bakteriensuspension auf 10% direkt auf die in Mikrotiterplatten vorgelegten Zellen gegeben. Der Ansatz wurde 30 min lang bei 4°C inkubiert. Nach 5-maligem Waschen erfolgte die Überführung der Zellen in die Zytozentrifuge.

2.2.10 Mikrozytotoxizitätstest

Dieser Test ermöglichte es, die Art der exprimierten HLA Moleküle von Lymphozyten mit Alloseren bzw. monoklonalen Antikörpen und Komplement zu bestimmen (Terasaki and McClelland, 1964). Bildet sich ein Antigen-Antikörper-Komplex, so wird das Kaninchenkomplement gebunden und aktiviert, die Zellmembran geschädigt und das später hinzugesetzte Eosin kann in die Zellen eindringen. Tragen die Zellen das HLA Produkt nicht, so findet keine Membranperforation statt und die Zellen bleiben ungefärbt. Die Durchführung erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Dr. C. Müller.

Unter das in Mikrotestkammern vorgelegte Decköl wurden je 1 µl eines anti-HLA Serums bzw. eines monoklonalen Antikörpers und 1 µl (4x10*3 Zellen) einer Zellsuspension gespritzt. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 5 µl Komplement zugegeben und nach weiteren 70 min (Inkubation bei HLA-DR Typisierungen nur 30 min) erfolgte die Zugabe von 3 µl Eosin (5% in A.dest). Den Farbstoff ließ man 7 min einwirken, bevor mit 5 µl einer 35%igen Formaldehydlösung (pH 7,0) fixiert wurde. Die Auswertung (Verhältnis tote zu lebenden Zellen) erfolgte im Phasenkontrastmikroskop der Fa. Leitz.

2.2.11 SB-Typisierung

Für die Typisierung von SB-Produkten wurden Reagenzien, die Herr Dr. Shaw, NCI, NIH, Bethesda, MD, (Shaw et al.,1980) freundlicherweise Herrn Dr. G. Pawelec überlassen hatte, in einem sogenannten CML-Test ("cell mediated lympholysis") eingesetzt. Die Durchführung wurde von Herrn Dr. G. Pawelec übernommen und erfolgte wie von Pawelec und Mitarbeitern, (1982) beschrieben. Die zu testenden Zielzellen wurden mit 51-Cr markiert und in verschiedenen Konzentrationen zu den Effektorzellen gegeben. Das Verhältnis Effektorzellen zu Zielzellen lag zwischen 50:1 und 100:1. Die spezifische Zytolyse nach 4 Stunden Kokultivierung wurde in "Lytic Units" (LU 25%) pro 10*7 Effektorzellen

ausgedrückt (Pawelec et al., 1982). Die statistische Auswertung wurde von Herrn M.Blaurock durchgeführt. Für diese Berechnung wurden die Rohwerte in %-Lyse umgerechnet: Werte-Spontanfreisetzung / Maximal-freisetzung - Spontanfreisetzung.

2.2.12 Karyotypenanalyse

Die Präparation und Auswertung der Karyotypen im Rahmen vergleichender zytogenetischer Untersuchungen der verschiedenen Mutanten erfolgte in Zusammenarbeit und unter Anleitung von Frau Prof. Dr. C. Fonatsch Institut für Humangenetik in Lübeck.

Die Aufarbeitung erfolgte nach dem Protokoll von Fonatsch und Mitarbeitern, (1980). 5x10*5 Zellen in 2 ml Kulturmedium wurden 2 h lang bei 37°C unter Einwirckung von 0,1 µg Colcemid (Fa. Gibco, Glasgow, UK) inkubiert. Die gleiche Anzahl Zellen wurde parallel nur 30 min lang bei 37°C mit 0,15 µg Colcemid belassen. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (7 min, 1000 UpM), der Überstand abgenommen und die Zellen aufgeschüttelt. Zur hypotonen Behandlung wurden den Zellen unter ständigem Bewegen des Röhrchens ca. 2 ml kalte KCL-Lösung (75 mM) tropfenweise zugesetzt und 20 min lang bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die gequollenen Zellen wurden abzentrifugiert (7 min, 800 UpM), nach Abnahme des Überstandes aufgeschüttelt und mit 10 ml eiskaltem Fixativ (Methanol:Eisessig; 3:1) langsam versetzt. Das Fixativ wurde nochmals gewechselt (7 min, 1000 UpM) und dann 20 min lang bei 22°C inkubiert. Um das gesamte Wasser zu entfernen, wurde das Fixativ erneut ausgetauscht. Nach der letzten Zentrifugation (7 min, 1200 UpM) wurde dann der Überstand komplett abgenommen, die Zellen in 0,5 ml Fixativ aufgenommmen und auf einen mit Wasser benetzten kalten Objektträger aufgetropft. Die Objektträger lagen zuvor zur Entfettung mindestens 24 h lang in Alkohol und wurden vor Gebrauch 2-mal in destilliertem Wasser bei 4°C inkubiert.

Die Objektträger wurden in 2xSSC-Salzlösung 23 h lang bei 60°C inkubiert. Anschließend wurden die Präparate 5 min lang in Phosphat-gepufferter 10%iger Giemsa-Lösung gefärbt.

2.2.13 Glyoxalase I Bestimmung

Die Bestimmung des Enzymes GLO I wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. J. Kömpf (Institut für Humângenetik in Tübingen) durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen 3-mal mit HBSS gewaschen, wobei die Zellen beim letzten Waschgang gezählt und so verteilt wurden, daß jede Probe exakt 1x10*7 Zellen in Suspension enthielt. Die Zellen wurden dann abzentrifugiert (5 min, 800 UpM), der Puffer vorsichtig abgesaugt und die Zellsedimente nach Kömpf und Mitarbeiter, (1975) weiter verarbeitet.

2.2.14 Quantitative Bindungstests

Die quantitative Expression von Klasse I und II Molekülen auf Mutanten im Vergleich zur Ausgangslinie wurde in Bindungsstudien mit radioaktiv markierten monoklonalen Antikörpern durchgeführt.

Humane Zellen wurden 2-mal mit HBSS gewaschen (Zentrifugation 10 min, 800 UpM) und nach der Zählung so eingestellt, daß in 100 µl HBSS 1x10*5 Zellen vorlagen. In jede Schale einer 96iger U-Form Mikrotiterplatte wurden 100 µl dieser Zellsuspension vorgelegt, die Zellen wurden 2 min lang bei 700 UpM abzentrifugiert und die Flüssigkeit entfernt. Zu den sedimentierten Zellen wurde soviel Kulturüberstand mit 3-H-Lysin markierten monoklonalen Antikörpern zugegeben, daß eine 100%ige Absättigung aller betreffenden Antigendeterminanten gewährleistet war. Die Ermittlung der einzusetzenden Antikörpermenge erfolgte in einer vorangegangenen Titration des radioaktiven Kulturüberstandes an konstanten Zellmengen. Nach kurzem Aufschütteln des Gemisches verblieb die Platte 30 min lang bei 4°C. Die nicht an

Antigene gebundenen Antikörper wurden durch 6-maliges Waschen mit HBSS/10%FCS entfernt. Durch Zugabe von 100 µl HBSS in jedes Schälchen konnten die Zellen resuspendiert und mit einer Pipette in Szintillationsröhrchen überführt werden. In jedes Röhrchen wurden noch 50 µl einer 1%igen SDS-Lösung zur Zellyse und 2 ml Szintillationscocktail hinzugefügt. Die Proben wurden in einem Flüssig-Szintillationszähler (Fa. Packard, Frankfurt) 1 min lang gezählt.

2.2.15 Radioaktiver Bindungstest

Mit diesem Test konnten Kulturüberstände von antikörpersezernierenden Hybridzellen auf Zellen einer Anzahl ausgesuchter Linien ausgetestet werden. Der Test wurde in Anlehnung an Williams, (1973) sowie Heinrichs und Mitarbeiter, (1980) in flexiblen Mikrotiterplatten mit U-förmigem Boden (Fa. Daynatech, Plochingen) durchgeführt. Die Zellen wurden 2-mal mit HBSS/AZ gewaschen und anschließend in einer Zellkonzentration von 1x10*5 Zellen pro Schale verteilt. Nach Zugabe von 25 µl Kulturüberstand von den Hybridzellen zu den vorgelegten Zellen wurden die Platten kurz auf einem Mikroshaker geschüttelt und dann bei 4°C für 30 min inkubiert. Durch 4-maliges Waschen mit HBSS/Az/BSA wurden die nicht gebundenen Antikörper entfernt und das 125-I-markierte Kaninchen anti-Maus IgG in 25 µl Einheiten zugesetzt. Nach weiterer 30 min Inkubation bei 4°C konnte das überschüssige jodierte anti-Maus IgG ausgewaschen werden (4-mal mit der Waschlösung, HBSS/Az/BSA). Die Platten wurden in einen Trockenschrank mit 60°C gestellt, bis das Zellsediment vollständig trocken war. Die Schalen der 96iger Platten wurden mit einem glühenden Draht abgetrennt und in Szintillationsröhrchen überführt. Die Messung erfolgte im Packard Autogamma Szintillationsspektrometer.

Für jede eingesetzte Zellinie diente W6/32.HL als positive und W6/32.HK als negative Kontrolle. Die Konzentration des markierten Kaninchen anti-Maus IgG's wurde so gewählt, daß die positive Kontrolle

eine cpm Ausbeute von ca. 2000 ergab, was etwa dem 10 bis 15-fachen der negativen Kontrolle entsprach.

2.2.16 Radioaktive Markierung von Zellen

Um HLA-Antigene nach der Präzipitation mit monoklonalen Antikörpern darstellen zu können, wurden die Proteine nach der von Ziegler und Pink, (1979) beschriebenen Methode radioaktiv markiert. 1x10*7 Zellen wurden mit 125I nach der Lactoperoxidaseprozedur markiert, anschließend lysiert (HBSS/Az/0,5% NP-40/1mM PMSF), die Zellkerne ausgeschleudert (10 min, 12 000 UpM) und das Zell-Lysat dann gegen das 500-fache Volumen eiskaltes HBSS/Az/1mM PMSF dialysiert.

Die intrazelluläre Markierung von Zellen mit 35-S-Methionin wurde wie folgt durchgeführt: 2x10*7 Zellen wurden mit methioninfreiem Medium (siehe 2.1.8) zweimal gewaschen, in 5 ml desselben Mediums aufgenommen und mit 250 µl 35-S-Methionin (250 µl = 250 mCi) versetzt. Nach ca. 15 h bei 37°C im Inkubator (5%CO2) konnten die Zellen abzentrifugiert (5 min, 4000 UpM) und das Zellpellet in 5 ml HBSS nochmals gewaschen werden (5 min, 4000 UpM). Zu dem Zellpellet wurde 1 ml HBSS/Az/0,5% NP-40/1mM PMSF pipettiert. Der Ansatz verblieb dann 1 h auf Eis. Kerne und andere Zellfragmente wurden anschließend durch Zentrifugation (15 min, 15000 UpM) ausgeschleudert. Um alle unspezifisch reagierenden Komponenten zu eliminieren, wurde der Überstand auf 5 Bakteriensedimenten von je 1 ml 10%iger Bakteriensuspension nacheinander für je 1 h inkubiert. Auf dem letzten Bakteriensediment verblieb das radioaktiv markierte Zell-Lysat über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag konnte dann mit der sequenziellen Immunpräzipitation begonnen werden (vergl. 2.2.18).

2.2.17 Immunpräzipitation des Antigen-Antikörperkomplexes

Das 125-I-markierte Zell-Lysat wurde nach beendeter Dialyse mit einem Bakteriensediment von 500 µl einer 10%igen Suspension für 30 min bei 4°C inkubiert. Um restlos alle unspezifischen Komponenten aus dem Lysat zu entfernen, transferierte man den Überstand nach erfolgter Zentrifugation (3 min, 2 000 UpM) nochmals auf ein Bakteriensediment, das zuvor mit humanem IgG bzw. IgM inkubiert worden war. Die Inkubationszeit betrug abermals 30 min bei 4°C. Nach der Zentrifugation (3 min, 6000 UpM) erfolgte eine letzte Absorption des Lysates auf unbeschichteten Bakterien (200 µl-Sediment, 30 min, 4°C). Der Überstand (3 min, 6000 UpM) wurde dann in soviele Portionen aufgeteilt, wie Antikörper verschiedener Spezifität eingesetzt werden sollten. Das Minimum an Radioaktivität pro Ansatz durfte jedoch nicht unter 1-2x10^6 cpm liegen. Zu jeder Probe wurden nun ca. 50 µl einer Bakteriensuspension zugesetzt, deren Bakterien, wie für den "direkten" bakteriellen Bindungstest beschrieben, mit zwei verschiedenen Antikörperpräparationen beschichtet waren. Die Proben wurden auf einer drehbar gelagerten Scheibe 1 h lang bei 4°C inkubiert. Das Präzipitat, bestehend aus Antigen, Antikörper, anti-Antikörper und Bakterium, wurde noch dreimal gewaschen (HBSS/AZ) und zuletzt mit dem Probenpuffer versetzt.

Die sequenzielle Immunpräzipitation von 35-S-Methionin markierten Antigenen erfolgte nach einem etwas anderen Schema. Das Lysat wurde nicht aufgeteilt, sondern in seinem gesamten Umfang mit dem jeweiligen Bakteriensediment für 1 h bei 4°C inkubiert. D.h. nach der Zentrifugation (3 min, 6000 UpM) wurde das Zell-Lysat auf ein neues, mit einem anderen spezifischen Antikörper beschichtetes Bakteriensediment pipettiert. Die Immunpräzipitate wurden vor der Aufnahme im Probenpuffer noch 3-mal gewaschen und jeder Ansatz in zwei gleich große Portionen aufgeteilt, wovon je eine mit Neuraminidase (20 µl = 0,1 Einheit in Phosphatpuffer) 2 h lang verdaut wurde. Alle Sedimente wurden in ca. 20 µl Probenpuffer aufgenommen.

2.2.18 Radioaktive Markierung moonoklonaler Antikörper

Für den radioaktiven Bindungstest wurde Ziege-anti Maus IgG von Herrn Dr.A.Ziegler nach der Chloramin T Methode (Williams, 1977) markiert. Die Inkorporation der radioaktiv markierten Aminosäuren 14-C-Lysin und 3-H-Lysin in Proteine wurde wie folgt durchgeführt: 2x10*5 Hybridzellen wurden 3-mal mit HBSS gewaschen, um alle Aminosäuren die im Medium enthalten sind zu entfernen. Anschließend wurde die Zellsuspension (0,2 ml) in 1,4 ml lysinfreiem Kulturmedium , 0,2 ml dialysiertem FCS und 0,2 ml 14-C-Lysin (50 µCi/ml) aufgenommen. Der Ansatz wurde 18 h lang bei 37°C unter 5%iger-CO2-Begasung inkubiert. Danach konnten die Zellen abzentrifugiert (3 min, 1 000 UpM) und der Überstand bis zur Verwendung bei -20°C eingefro ren werden.
Bei der Inkorporation von 3-H-Lysin wurden 1x10*7 Hybridzellen 3-mal mit HBSS gewaschen, in 3,5 ml lysinfreiem Medium aufgenommen und mit 0,5 ml dialysiertem FCS sowie 1 ml 3-H-Lysin (1mCi/ml) zugesetzt. Nach einer Inkubation von 16 h (37°C, 5%-Co2-Begasung) wurden die Zellen abzentrifugiert (7 min, 1 000 UpM), der Überstand vorsichtig abgehoben und sofort in Dialyseschläuche überführt. Die Dialyse erfolgte gegen HBSS/Az bei 4°C um den größten Teil des noch nicht eingebauten 3-H-Lysins zu entfernen. Die Aufbewahrung erfolgte bei -20°C.

2.2.19 Polyacrylamid-Gel-Elektrophoresen (PAGE)

2.2.19.1 SDS-PAGE

Zur Analyse von radioaktiv markierten Antigenen, die mittels der Immunpräzipitation isoliert werden konnten, wurden 10%ige Acrylamidgele nach der Methode von Ziegler und Mitarbeiter, (1974) hergestellt. Nach Zusammenbau der Elektrophoresekammer (siehe Studier, 1973) und nach P

Polymerisation des Trenngeles wurden die zu trennenden Proben mit Probenpuffer versetzt, 1 min lang auf 100°C erhitzt, und dann in die Geltaschen gefüllt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Stromstärke von 40 mA. Nach der Fixierung und Trocknung des Gels wurde auf einem Fuji Rx-Film (Fa.Hirrlinger, Stuttgart) autoradiographiert.

2.2.19.2 SDS-PAGE nach Lämmli

Zur Ermittlung der Immunglobulinklasse wurden mit 14-C-Lysin radioaktiv markierte monoklonale Antikörper von reklonierten Hybriden in der SDS-PAGE nach Lämmli, (1970) aufgetrennt. Die Proben wurden unter reduzierenden Bedingungen denaturiert und auf dem Gel aufgetrennt. Das Mischungsverhältnis der radioaktiv markierten Antikörperlösung zum Probenpuffer war 1:1. Das Gel lief bei konstant 40 Volt so lange, bis die durch Bromphenolblau sichtbare Front das untere Ende des Gels erreicht hatte. Nach 30 min in "Enhance" (New England Nuclear) und 30 min in A.dest wurde das Gel getrocknet und anschließend autoradiographiert (Fuji Rx-Film).

2.2.19.3 Isoelektrofokussierung (IEF)

Bei diesem Verfahren wurde die Auftrennung der elektrisch geladenen HLA-Moleküle in einem pH-Gradienten in vertikal angelegten IEF-Gelen durchgeführt. Harnstoff, Acrylamidlösung, A.dest und "Ampholine"-Mischung (2.1.9) wurden durch einen Filter (0,22 um) gepreßt und nach Zugabe von TEMED (N,N,N',N'- tetramethylethylendiamin) und Ammoniumpersulfat in die vorbereitete Gelkammer gegossen. Nach ca. 2 h war das 2 mm starke Gel auspolymerisiert und die in Probenpuffer gelösten Immunpräzipitate konnten mit einer Hamiltonspritze in die Geltaschen gefüllt werden. Um ein Aufwirbeln oder eine Vermischung der Proben bei der Zugabe des Kathodenpuffers zu umgehen, wurden sie mit einem Probenpuffer (siehe 2.1.9) überschichtet. Die Elektrophorese

wurde bei 400 Volt durchgeführt und nach ca. 16 h beendet, nachdem die Spannung während der letzten Stunden auf 800 Volt erhöht worden war, um eine optimale Konzentrierung der Banden zu erreichen.
Das Gel wurde nach der Behandlung mit "Enhance" und A.dest getrocknet und anschließend autoradiographiert (Fuji-Rx-Film).

3. Ergebnisse

3.1 Herstellung von HLA-Mutanten

3.1.1 Klonierung einer humanen Zellinie

Um eine genetisch homogene Zellpopulation zu erhalten, wurde die Epstein-Barr-Virus superinfizierte Lymphomlinie BJAB.B95.8 kloniert. Dazu wurden die Zellen in einer Konzentration von 0,2 Zellen pro Schale in Platten verteilt. Sowohl Milzzellen als auch bestrahlte Makrophagen wurden als Füllerzellen eingesetzt. Nach ca. sechs Tagen konnten ausschließlich Zellkolonien in jenen Schalen gefunden werden, in denen Makrpohagen zugesetzt worden waren. Die Klonierungseffizienz der BJAB.B95.8 Zellen lag bei 70-80%. Für alle nachfolgenden Versuche wurde der Klon BJAB.B95.8.6 eingesetzt. Weitere Linien wie ERL, SK-1, MS8482, BJAB und BJAB-HR1K zeigten in entsprechenden Versuchen eine so geringe Klonierungseffizienz, daß von einer weiteren Verwendung abgesehen wurde.

3.1.2 Ermittlung der optimalen Bestrahlungsdosis

Um innerhalb einer Zellpopulation den Anteil an mutierten Zellen zu erhöhen, ohne das Überleben der Population zu gefährden, mußte eine Dosis-Wirkungskurve erstellt werden. Dafür wurden 5x10*5 BJAB.B95.8.6 Zellen unterschiedlich lange Gammastrahlen ausgesetzt. Die in Abbildung 4 dargestellte Dosis-Wirkungskurve zeigte wie erwartet eine kontinuierliche Abnahme der Zellzahl bei Erhöhung der Srahlendosis. Bei der Zellpopulation, die mit 3 Gy bestrahlt worden war, konnte nach 5 Tagen nur noch 1/10 der Zellmenge im Vergleich zu einem nicht bestrahlten Ansatz (K=Kontrolle) ermittelt werden. Abbildung 5 zeigt den Wachstumsverlauf von Zellen, die unterschiedlichen Dosen von ionisierender Strahlung ausgesetzt wurden, über einer Zeitraum von 165 Stunden. Auch hier war mit der Steigerung der Dosis ein Rückgang der

Proliferation der Zellen im Vergleich zu einer nicht bestrahlten Zellpopulation deutlich. Bei einer Dosis von 3,5 Gy bildete sich nach ca. 100 h ein Gleichgewicht zwischen Sterberate und Wachstumsrate der Zellen aus, wohingegen bei einer Dosis von 3 Gy eine leichte Zunahme der Zellzahl und somit eine dauerhafte wachsende Zellpopulation erhalten werden konnte. Dieser Umstand führte dazu, daß für nachfolgende Selektionen die Zellen immer mit 3 Gy bestrahlt wurden.

Nicht im HLA-Komplex mutierte Zellen einer Population sollten sich im folgenden Versuchsschritt über eine Komplement-Bindungsreaktion mit HLA-spezifischen Antikörpern durch Lyse aus den Ansätzen entfernen lassen, was zu einer Anreicherung verschiedener HLA-Mutanten innerhalb der Population führt .

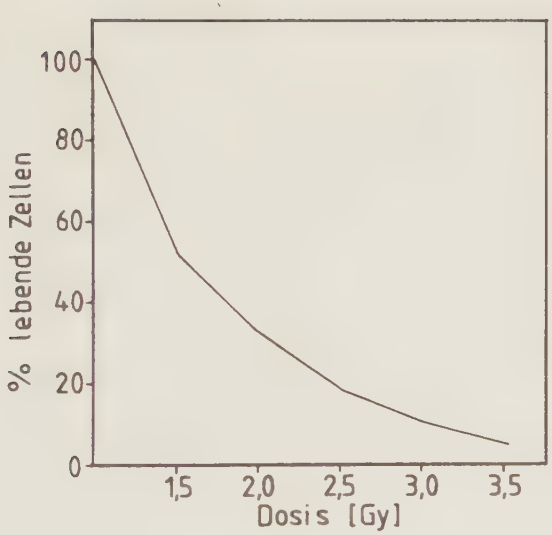


Abbildung 4 Dosis-Wirkungs-Kurve von Gammastrahlen auf humane Zellen.
Je 5x10*5 BJAB.B95.8.6 Zellen wurden steigenden Dosen ionisierender Strahlung ausgesetzt. Fünf Tage nach erfolgter Bestrahlung wurde die Zellzahl in den einzelnen Proben ermittelt.
Die Graphik zeigt die Zahl lebender Zellen 5 Tage nach Versuchsbeginn im Vergleich zu einem nicht bestrahlten Kontrollansatz (100%) in Abhängigkeit von der eingesetzten Strahlendosis.

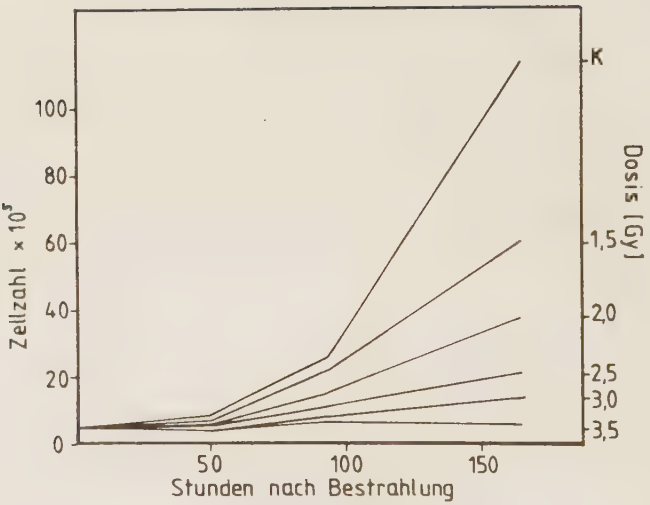


Abbildung 5 Sequenzielle Ermittlung des Zellwachstums nach der Bestrahlung.
Je 5x10*5 BJAB.B95.8.6 Zellen wurden unterschiedlichen Dosen (1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 Gy) ionisierender Strahlung ausgesetzt. Innerhalb von 165 Stunden nach Versuchsbeginn wurde die Zellzahl jedes Ansatzes zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten ermittelt und in Abhängigkeit von der eingesetzten Strahlendosis sowie des Zählzeitpunktes dargestellt. Als Kontrolle (K) diente ein nicht bestrahlter Ansatz von BJAB.B95.8.6 Zellen.

3.1.3 Prüfung des Komplements hinsichtlich unspezifischer zytotoxischer Eigenschaften

Die gezielte Selektion von Zellen über die HLA-Antigene erfordert sowohl spezifische Antikörper, die sich an die jeweiligen Antigene anlagern, als auch Komplement, das an den CH2-Abschnitt des Immunglobulines bindet und die Lyse der Zellen einleitet. Um sicherzustellen, daß im Serum keine Komponenten enthalten waren, die zu einer unspezifischen Lyse der Zellen führen konnten, wurde folgender Versuch ausgeführt: BJAB.B95.8.6 Zellen wurden mit den monoklonalen Antikörpern W6/32.HK bzw. W6/32.HL inkubiert und anschließend mit Komplement versetzt. Wie erwartet konnten alle Zellen lysiert werden, die zuvor mit W6/32.HL (spezifisch gegen Klasse I Antigene) inkubiert worden waren. Aber auch jene Zellen, die mit W6/32.HK (inaktive Variante von W6/32.HL) vorbehandelt wurden, zeigten eine bis zu 50%ige Lyserate.

Daraufhin erfolgte die Absorbtion von Komplement an verschieden große Mengen (1x10*7-1x10*8) BJAB.B95.8.6 Zellen. Die Komplementproben wurden dann nochmals wie oben beschrieben ausgetestet. Das Resultat war, daß alle unspezifisch mit den Zellen reagierenden Komponenten aus dem Serum des Kaninchens entfernt werden konnten, wenn für 1 ml Komplement 6x10*7 Zellen zur Absorbtion zur Verfügung standen. Gleichzeitig war kein Verlust der Aktivität des Komplements zu erkennen, was durch die Lyse aller Zellen unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers W6/32.HL demonstriert werden konnte.

3.1.4 Selektion von Zellen mit zytotoxischen Antikörpern und Komplement

Die Selektion von Zellen mit einer veränderten Expression von HLA-Antigenen erfordert Reagenzien, die spezifisch HLA-Determinanten erkennen und daran binden, sowie in der Lage sind, Komplement zu fixieren. Beispielsweise kann eine Zelle, die keine Klasse I Antigene mehr exprimiert, nicht mit dem Antikörper W6/32.HL nach

Komplementzugabe lysiert werden. Hingegen werden alle anderen Zellen, die mehr oder minder noch HLA-A, B oder C Antigene tragen von W6/32.HL erkannt und letztlich durch Komplement abgetötet.

Gammabestrahlungen ausgesetzte Zellen des Klons BJAB.B95.8.6 (mit den HLA-Klasse I Antigenen A1, A2, B13, Bw35, Bw4 und Bw6) wurden einer ganzen Reihe einzelner monoklonaler Antikörper (TÜ48, 101, 109, 110, W6/32.HL) ausgesetzt, die spezifisch an HLA-Klasse I Antigene dieser Linie binden konnten. Sowohl die Selektion von Zellen mit nur einem monoklonalen Antikörper gegen ein HLA-Klasse I Antigen, als auch die kombinierte Applikation zweier Reagenzien an den bestrahlten Zellen (TÜ48/109; TÜ48/101; TÜ101/109; TÜ101/110; TÜ109/110) führte zu keiner Isolierung von Zellen, die in ihrem HLA-Phänotyp von denen der BJAB.B95.8.6 Zellinie differierten. Selbst eine bis zu viermalige Wiederholung der Selektion an ein und derselben Zellpopulation zu verschiedenen Zeitabständen (5 h; 24 h) brachte keinen Erfolg. Erst nachdem 1x10*7 zuvor bestrahlte BJAB.B95.8.6 Zellen mit einem Cocktail aus drei -gegen die HLA-Determinanten Aw23, Aw24, Aw32, Bw4, HLA-Bw4 und HLA-A2, A28 gerichteten- monoklonalen Antikörpern (TÜ48, 109, 101) selektioniert wurden, konnten Zellen kultiviert werden, die sich in der HLA-Expression von den Wildtypzellen BJAB.B95.8.6 unterschieden.

Zwei bis drei Wochen nach der Selektion waren in 15 von 960 Schalen der Kulturplatten lebende Zellen zu erkennen, die die Bezeichnung BM1-BM15 erhielten. Die Testung dieser Zellen auf mögliche Veränderungen in der HLA-Antigenexpression im Vergleich zur Ausgangslinie erfolgte im indirektern bakteriellen Bindungstest mit den für die Selektion eingesetzten monoklonalen Antikörpern (TÜ48, 101, 109), mit W6/32.HL und W6/32.HK, als positive und negative Kontrolle, sowie dem Antikörper Tü110, der spezifisch HLA-B13 Antigene erkennt. Es konnte weder eine Reaktion der Zellen BM1 bis BM15 mit den zur Selektion eingesetzten monoklonalen Antikörpern, noch mit TÜ110 gezeigt werden (Tab. 3). Anhand der ausgebliebenen Reaktion der Zellen mit TÜ48, 101, 109 und TÜ110 konnte darauf geschlossen werden, daß HLA-A2, B13 und Bw4 Moleküle nicht mehr auf den Zellen BM1-BM15 exprimiert wurden. Dennoch mußten HLA-Klasse I Produkte noch auf den Zellen vorhanden sein, da

alle Linien mit dem monoklonalen Antikörper W6/32.HL reagierten. Es konnte also angenommen werden, daß es gelungen war, humane Zellen mit verändertem HLA-Phänotyp zu etablieren.

Tabelle 3 Reaktion der unklonierten, nach Gammabestrahlung selektionierten BM1-BM15 Zellen sowie der BJAB.B95.8.6 Wildtypzellen mit monoklonalen Antikörpern im indirekten bakteriellen Bindungstest.

	Monoclonale Antikörper					
Zellinien	W6/32.HK	W6/32HL	TÜ48	TÜ101	TÜ109	TÜ110
BJAB.B95.8.6	-	+	+	+	+	+
BM 1	-	+	-	-	-	-
BM 2	-	+	-	-	-	-
BM 3	-	+	-	-	-	-
BM 4	-	+	-	-	-	-
BM 5	-	+	-	-	-	-
BM 6	-	+	-	-	-	-
BM 7	-	+	-	-	-	-
BM 8	-	+	-	-	-	-
BM 9	-	+	-	-	-	-
BM10	-	+	-	-	-	-
BM11	-	+	-	-	-	-
BM12	-	+	-	-	-	-
BM13	-	+	-	-	-	-
BM14	-	+	-	-	-	-
BM15	-	+	-	-	-	-

"+" bedeutet eine Reaktion, (mehr als 3 Bakterien/Zelle)
"-" bedeutet keine Reaktion, (0-3 Bakterien/Zelle) der Zellen mit monoklonalen Antikörpern

3.2. Charakterisierung der Mutanten

Vor einer eingehenden Charakterisierung wurden alle 15 Zellpopulationen (BM1-BM15) kloniert (0,2 Zellen/Schale). Auch hier zeigte sich, daß die Zugabe von bestrahlten Makrophagen einer BALB/c Maus gegenüber Milzzellen vorzuziehen war. Die Klonierungseffizienz aller BM-Zellen lag im Durchschnitt bei 47%. Von jeder der 15 Zellpopulationen wurden bis zu 5 Klone hochgezogen und eingefroren. Die Zahl hinter dem Punkt in der verwendeten Nomenklatur der jeweiligen Zellpopulation (z.B. BM1; BM1.5) bezeichnet die Nummer des jeweiligen Klones.

3.2.1. HLA-Antigenexpression von Wildtypzellen und Mutanten im direkten bakteriellen Bindungstest

Das Prinzip des bakteriellen Bindungstests beruht auf dem Umstand, daß Protein A von Staphylococcus aureus an den Fc-Teil eines anti-Maus spezifischen Immunglobulins bindet, das wiederum seinerseits an monoklonale Antikörper - die von Fusionen mit Myelomzellen der Maus abstammen- binden können. Dies bedeutet, daß mittels der Bakterien nicht nur Antigene auf Zellen nachgewiesen werden können, sondern daß zusätzlich noch eine quantitative Aussage über die Antigendichte gemacht werden kann (gemessen an der Anzahl der gebundenen Bakterien; siehe Abb. 6).

Die Reaktion von Wildtypzellen und drei verschiedenen klonierten Mutanten (BM1.5, BM2.2, BM5.2) mit monoklonalen Antikörpern im direkten bakteriellen Bindungstest ist in Tabelle 4 stellvertretend für je einen Klon der 15 aus der Selektion hervorgegangenen BM-Ausgangsmutanten dargestellt. Die Zellen aller Linien reagierten ausnahmslos mit dem Antikörper W6/32.HL; jedoch schien die Menge an Klasse I Molekülen im Vergleich zu Wildtypzellen bei den Mutanten um bis zu 30% reduziert. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der nicht klonierten Linien (3.1.4) konnte auch bei den Klonen das Antigen HLA-A2 (TÜ101, XV-17.1) nicht

mehr nachgewiesen werden. Das HLA-Antigen Bw6 (SFR8-B6) war konstant auf allen Mutanten vorhanden, während die "private" Spezifität HLA-B13 (TÜ110) und die HLA-B13-assoziierte "supertypische" Spezifität HLA-Bw4 (TÜ48) nicht mehr gefunden werden konnte.

Der zur Selektion eingesetzte monoklonale Antikörper TÜ109 (spezifisch für HLA-Bw4) reagierte im indirekten bakteriellen Bindungstest (Tab. 3) mit keiner der mutierten Zellen. Im direkten bakteriellen Bindungstest war dagegen eine quantitativ zwar geringe, jedoch eindeutige Reaktion der Zellen festzustellen. Unterschiede in der Reaktivität von HLA-Klasse II spezifischen monoklonalen Antikörpern zwischen den getesteten Mutanten und der Wildtyplinie konnte einzig mit YD1/63.HLK gefunden werden. Mit ca. 30-40% der Mutanten reagierte dieser Antikörper nicht mehr. Über dieses Reagenz ist bisher bekannt, daß es in Abhängigkeit vom HLA-Haplotyp eine Subpopulation von HLA-DR und SB Molekülen erkennt. Alle anderen Klasse II spezifischen monoklonalen Antikörper (TÜ22,34,35,36,37,39,43) zeigen keine klaren Unterschiede zwischen den Wildtypzellen und den Mutanten, weder in der Anzahl an positiven Zellen, noch in der Menge an genundenen Bakterien an der Zelloberfläche.

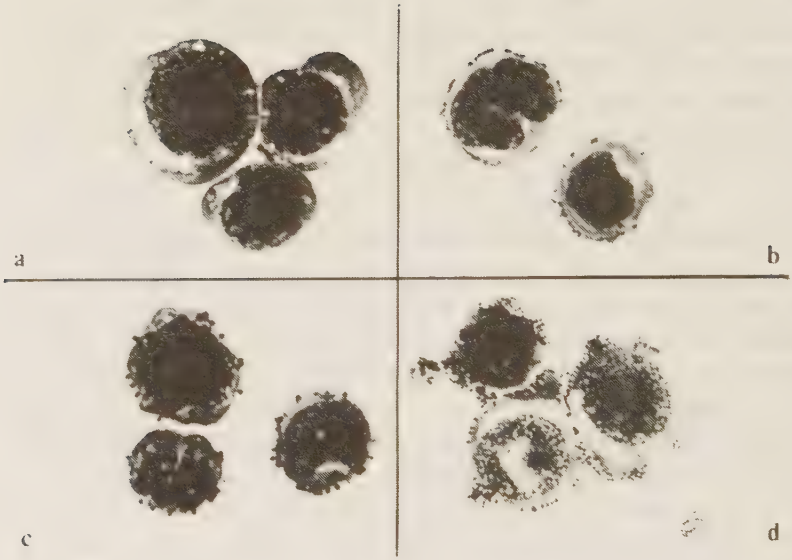


Abbildung 6 Zytozentrifugenpräparate von BM2.2 Zellen des bakteriellen Bindungstestes nach Inkubation der Zellen mit a) W6/32.HK b) TÜ109 c)TÜ22 d) TÜ39 beschichteten Bakterien. Nach der Fixierung und Färbung der Präparate in May-Grünwald und Giemsa-Lösung ist die Verteilung und Anzahl der an die Zelloberfläche gebundenen Bakterien erkennbar (Vergrößerung 100x7,2).

Tabelle 4

Reaktion von Zellen der Klone BM1.5, BM2.2 und BM5.2 sowie von BJAB.B95.8.6 Wildtypzellen mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern im direkten bakteriellen Bindungstest.

Monoklonale Antikörper	Zellinien							
	BJAB.B95.8.6		BM 1.5		BM 2.2		BM 5.2	
	%	* /**	%	* /**	%	* /**	%	* /**
W6/32.HL	100	80-200/150	100	80-180/120	100	80-180/110	100	50-150/120
W6/32.HK	0	0	0	0	0	0	0	0
TÜ 25	0	0	0	0	0	0	0	0
TÜ101	97	20-80/40	0	0	0	0	0	0
XV-17.1	99	10-80/40	0	0	0	0	0	0
TÜ 48	99	20-80/40	0	0	0	0	0	0
TÜ109	100	10-80/30	91	5-50/15	99	10-50/15	93	5-50/20
TÜ110	99	20-100/40	0	0	0	0	0	0
SFR8.B6	100	10-100/35	100	20-80/40	100	20-80/30	100	30-100/40
TÜ 22	100	20-100/50	97	10-100/50	99	20-120/60	98	20-80/50
TÜ 34	99	10-60/45	100	10-60/35	100	10-70/50	99	20-60/40
TÜ 35	99	25-100/50	94	10-80/40	100	10-100/35	98	10-80/40
TÜ 36	100	10-80/45	100	10-80/30	98	20-80/50	99	10-80/40
TÜ 37	98	20-80/50	98	20-100/50	99	20-80/55	97	20-100/50
TÜ 39	99	20-100/70	98	20-100/70	100	20-100/65	100	20-100/65
TÜ 43	100	15-100/70	99	20-100/70	100	20-100/70	100	25-100/75
YD1/63.HLK	95	6-50/25	70	4-30/10	56	4-50/15	68	4-50/15

% Prozent Zelleneiner Population, die Bakterien an der Zelloberfläche gebunden haben

* [illegible] gebundenen Bakterien pro Zelle

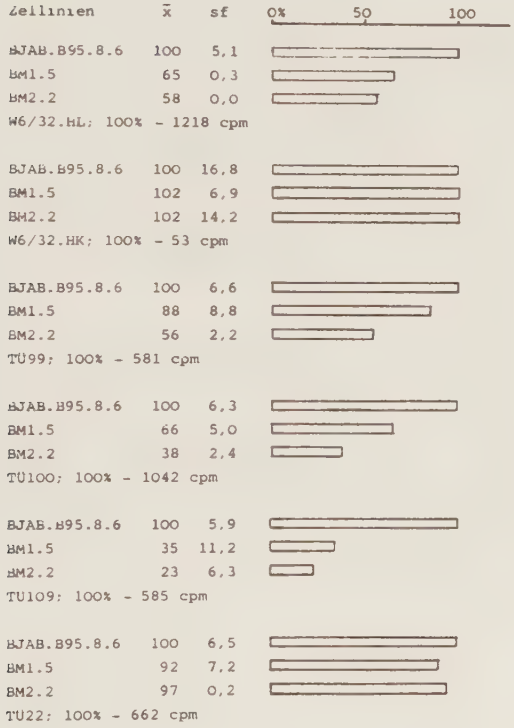
** Durchschnittliche Bakterienanzahl auf den Zellen

3.2.2. Quantitative Studien zur HLA-Antigenexpression

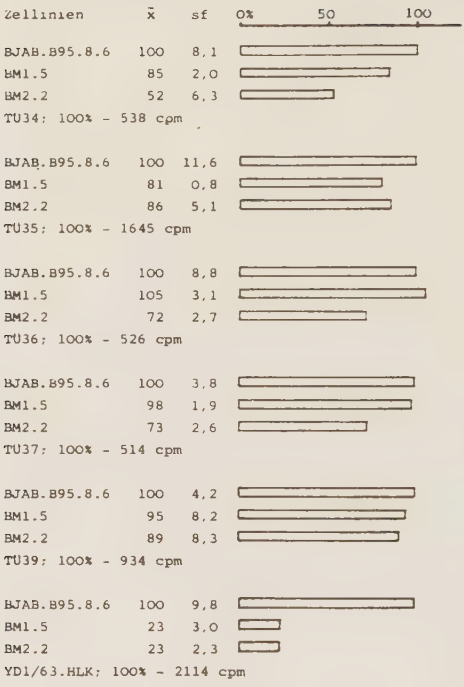
Im direkten bakteriellen Bindungstest konnten nicht nur einige HLA-Determinanten nicht mehr nachgewiesen werden, sondern es schien auch eine generelle quantitative Verringerung der HLA-Antigene bei manchen Zellen zu geben. Mit Hilfe des radioaktiven Bindungstestes (2.2.14) wurde versucht diese Daten zu verifizieren. Hierzu wurden die Zellen BJAB.B95.8.6 ,BM1.5 und BM2.2 mit 3-H-markierten monoklonalen Antikörpern (2.2.17) behandelt.

Die Ergebnisse der Expression von Klasse I und II Molekülen auf den Zellen zeigt die Abbildung 7. Der Szintillationsmeßwert, der nach Bindung von radioaktiv markierten monoklonalen Antikörpern an Zellen der BJAB.B95.8.6 Linie erhalten wurde, ist immer gleich 100% gesetzt. Die Meßdaten der Mutanten wurden darauf bezogen. Eine signifikante Verringerung von Klasse I Determinanten bei den Mutanten BM1.5 bzw. BM2.2 im Vergleich zum Wildtyp war mit dem Antikörper W6/32.HL (35%/42%), TÜ99 (44% nur bei BM2.2), TÜ100 (34%/62%) und TÜ109 (65%/77%) zu erkennen. Konstante Werte bei allen drei Linien konnten wie erwartet beim Antikörper W6/32.HK erzielt werden, der auch hier als Kontrolle eingesetzt worden war. Bei den Klasse II Antigenen war mit den Antikörpern TÜ22, TÜ35 und TÜ39 bei keiner der Mutanten eine signifikante Abweichung der gebundenen Aktivität gegenüber der Ausgangslinie festzustellen. Mit dem Antikörper TÜ36 und TÜ37 reagierten BM1.5 Zellen wie BJAB.B95.8.6 Zellen, während BM2.2 eine Verringerung um 28% und 27% erkennen ließ. Mit dem Antikörper TÜ34 war die Bindung um 15% bei BM1.5 und 48% bei BM2.2 Zellen verringert. Ein Verlust von bis zu 85% der Klasse II Antigene, die von YD1/63.HLK erkannt werden, war bei beiden Mutanten festzustellen. Reaktionen der Antikörper TÜ48, 101, 110, 160 und TÜ161 (3.3.2.1) mit den Mutanten konnten auch in diesem Testsystem nicht nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht dargestellt).

Abbildung 7 Quantitative Bestimmung der HLA-Antigenexpression von BJAB.B95.8.6, BM1.5 und BM2.2 Zellen anhand von 3-H-Lysin markierten monoklonalen Antikörpern im radioaktiven Bindungstest. Die Meßergebnisse (gebundene 3-H-Aktivität in cpm) für die Wildtypzellen BJAB.B95.8.6 sind jeweils gleich 100% gesetzt.



Fortsetzung der Abbildung 7



$\bar{x}$ Mittelwert in %
sf Standardfehler

3.2.3. Typisierung der Mutanten im Mikrozytotoxizitätstest

3.2.3.1 Mikrozytotoxizitätstest mit Klasse I spezifischen monoklonalen Antikörpern

Um sicherzustellen, daß die Klasse I Moleküle HLA-A2, B13 und Bw4 nicht doch noch in sehr geringer Menge von den Mutanten exprimiert wurden, erfolgte die Überprüfung sowohl mit Hybrid-Überständen als auch mit Aszitesflüssigkeit (soweit vorhanden) im Mikrozytotoxizitätstest. In diesem Test trat eine Lyse der Zellen nach Komplementgabe ein, wenn spezifisch HLA erkennende zytotoxische Antikörper binden konnten. In diesem Test wurden noch 3 weitere HLA-A2, A28 spezifische Antikörper (4B; A2,2M1; FMC-5) eingesetzt um außzuschließen, daß es sich um Strukturvarianten des untersuchten HLA-Antigenes handelte. Für HLA-B13 und HLA-Bw4 Antigene standen ausschließlich die monoklonalen Antikörper TÜ48, 109 und TÜ110 zur Verfügung. Aus Tabelle 5 ist ersichtlich, daß sowohl bei TÜ48 als auch bei TÜ110 unabhängig von der Antikörperkonzentration die Zellen nicht mehr lysiert wurden. Tü109 schien dagegen mit steigender Antikörperkonzentration neben HLA-Bw4 an weiteren Strukturen auf den Zellen binden zu können (vergl. 3.2.1 und 3.2.2). Mit HLA-A2, A28 erkennenden Reagenzien konnte keine der Mutanten reagieren was für die Abwesenheit dieser Strukturen auf den Zellen sprach. Als positive Kontrolle wurde der monoklonale Antikorper SFR8-B6 spezifisch gegen HLA-Bw6 eingesetzt.

Tabelle 5 Reaktion einzelner klonierter Mutanten im Mikrozytotoxizitätstest mit verschiedenen Klasse I spezifischen monoklonalen Antikörpern

	Monoclonale Antikörper							
Zell-	TÜ48	TÜ109	TÜ110	TÜ101	4B	A2,2M1	FMC-5	SFR8-B6
linien	Ü A	Ü A	Ü A	Ü	Ü	Ü	Ü	Ü
BJAB.	+ +	+ +	+ +	+	+	+	+	+
B95.8.6								
BM 1.5	- -	- +	- -	-	-	-	-	+
BM 2.2	- -	- +	- -	-	-	-	-	+
BM 4.2	- -	- +	- -	-	-	-	-	+
BM 5.2	- -	- +	- -	-	-	-	-	+
BM 8.5	- -	- +	- -	-	-	-	-	+
BM 9.1	- -	- +	- -	-	-	-	-	+
BM10.1	- -	- +	- -	-	-	-	-	+
BM14.1	- -	- +	- -	-	-	-	-	+
BM15.3	- -	- +	- -	-	-	-	-	+

Ü: Hybrid-Überstand

A: Aszitesflüssigkeit (1:10 Verdünnung)

"+" Zellen wurden lysiert

"-" Zellen wurden nicht lysiert

3.2.3.2 Mikrozytotoxizitätstest unter Verwendung von Alloantiseren

Um alle von den Mutanten noch exprimierten HLA-Antigene zu definieren, erfolgte die Austestung der Zellen im CTX an Alloantiseren des 9. Internationalen Whorkshops.

Die Typisierung der BJAB.B95.8.6 Zellinie konnte zeigen, daß die HLA-Antigene A1, A2, B13, Bw35, Bw4, Bw6, Cw4, DR5, MT1/MB1, MT2, MB3 exprimiert waren. Die Definierung des 2. HLA-DR Allels der Wildtyplinie konnte nicht eindeutig vorgenommen werden, da sowohl mit einem HLA-DRw10 spezifischen Alloantiserum als auch mit einem HLA-DR2 spezifischen monoklonalen Antikörper (NDS.15.38, im indirekten bakteriellen Bindungstest) Reaktionen auftraten (A.Ziegler, pers. Mitteilung). Insgesamt wurde jeweils ein Klon jeder Mutanten untersucht. Bei all diesen konnten keine HLA-A2, B13 und Bw4 Moleküle mehr nachgewiesen werden. Hingegen mit spezifischen HLA-A1, Bw35, Bw6 und Cw4 Alloantiseren konnten die Zellen lysiert werden. Ebenso konnte gezeigt werden, daß die Klasse II Antigene HLA-DR5, MT2 und MB3 von allen Mutanten exprimiert wurden. Unterschiede in der Expression von Molekülen zur Ausgangslinie und innerhalb der isolierten Mutanten konnte erstmals bei HLA-MT1/MB1 gefunden werden. Sechs Zellinien (BM2.2; BM3.1; BM4.1; BM12.1; BM13.1; BM14.1) reagierten mit MT1/MB1 Alloantiseren, wohingegen die anderen 9 Mutanten (BM1.5; BM5.2; BM6.3; BM7.4; BM8.5; BM9.1; BM10.1; BM11.1; BM15.3) keine Reaktion mehr mit den Alloantiseren zeigten (Tab. 6). Während sämtliche Mutanten genau wie die BJAB.B95.8.6 Wildtypzellen durch DRw10 spezifische Alloantiseren lysiert werden konnten, traten mit dem gegen HLA-DR2 spezifischen monoklonalen Antikörper (im indirekten bakteriellen Bindungstest) nur dann Reaktionen auf, wenn die betreffende Mutante gleichzeitig im Mikrozytotoxizitätstest für MT1/MB1 positiv war (A.Ziegler, pers. Mitteilung).

Somit waren deutliche Unterschiede bei den isolierten Mutanten nicht nur in der Expression von Klasse I, sondern auch bei Klasse II Molekülen festzustellen.

Tablle 6 Charakterisierung von Antigendeterminanten der Mutanten mit Alloantiseren im Mikrozytotoxizitätstest. Außerdem ist die Reaktion der Zellen mit SB2 und SB4 spezifischen Effektor-lymphozyten in CML-Studien dargestellt (vergl. hierzu 3.2.4).

Zell-	HLA-Produkte												
linien	A1	A2	B13	Bw35	Bw4	Bw6	Cw4	DR5	MT1/MB1	MT2	MB3	SB2	SB4
BJAB.													
B95.8.6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BM 1.5	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+
BM 2.2	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
BM 3.1	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
BM 4.1	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+		nt
BM 5.2	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
BM 6.3	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
BM 7.4	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+*
BM 8.5	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+		nt
BM 9.1	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+		nt
BM10.1	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+
BM11.1	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
BM12.1	+	-	-	+	-	+	+	+	+*	+	+	+	+*
BM13.1	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
BM14.1	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+		nt
BM15.3	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+*

* = es wurde nur ein Test durchgeführ

nt = nicht getestet

3.2.4 Typisierung der SB-Antigene

Die Typisierung der SB-Antigene von BJAB.B95.8.6 Zellen und den Mutanten erfolgte im CML-Test ("cell mediated lympholysis"). Zur Bestimmung der SB-Moleküle der Wildtypzellen wurden sie mit Effektorzellen spezifisch gegen HLA-SB1, SB2, SB3, SB4 und SB5 Antigene inkubiert. Nur in jenen Proben, in der die Effektorzellen das spezifische Antigen auf den Zielzellen erkannten, wurden die Zellen lysiert, was durch die Freisetzung von Radioaktivität ins Medium gemessen werden konnte. Die Versuche zeigten, daß BJAB.B95.8.6 Zellen heterozygot für HLA-SB waren. Sie exprimierten die HLA-Antigene SB2 und SB4. Insgesamt 12 Mutanten wurden im CML-Test auf die Expression von HLA-SB2 und SB4 untersucht. Alle SB-Typisierungsdaten der Mutanten sind in Tabelle 6 zusammen mit den Ergebnissen des CTX dargestellt. Detaillierte Versuchsdaten von Zellen der Linien BJAB.B95.8.6, BM1.5, BM2.2 und BM5.2 sind in Tabelle 7 dargestellt. Als Kontrolle in allen Versuchen wurde die HLA-SB2 und SB4 Zellinie KR3598 eingesetzt. Auf allen Zellen ließen sich die SB4-Determinanten nachweisen, die SB2 Moleküle jedoch nur noch auf den Linien BM2.2, BM5.2 und dem Wildtyp. Die Mutante BM1.5 war für dieses Klasse II Molekül nicht mehr typisierbar. Weitere CML Versuche mit den Mutanten ließen noch drei weitere SB2-negativen Klone (BM7.4; BM10.1 BM15.3) erkennen. Die fünf Mutanten BM3.2, BM6.3, Bm11.1, BM12.1 und BM13.1 konnten wie der Wildtyp von den HLA-SB2 spezifischen Effektorzellen lysiert werden.

Tabelle 7 SB-Typisierung von BJAB.B95.8.6 Zellen und zweier Mutanten im CML-Test mit vier HLA-SB Effektorzellen.

Effektorzellen	Zielzellen				
für SB-Antigene	KR3598*	BJAB.B95.8.6	BM1.5	BM2.2	BM5.2
2A	128	190	0,1	136	531
2B	203	598	0,1	116	1960
4A	106	178	275	202	1693
4B	248	136	123	738	1036

Es wurden Effektorlymphozyten spezifisch für SB2 bzw. SB4-Mcleküle mit 51-Cr markierten Zielzellen 4h lang inkubiert. Das Ausmaß der lymphozytotoxischen Reaktionen konnte im einzelnen direkt über die freigesetzte Radioaktivität aus den zerstörten Zielzellen im Überstand ermittelt werden. Alle Werte sind in "Lytic-Units (LU 25%) pro 1x10*7 Effektorzellen ausgedrückt.

* Kontrollinie für SB2 und SB4 Determinanten

3.2.5 Zytogenetische Untersuchung der Zellen

Die doch erheblichen Unterschiede im HLA-Phänotyp zwischen der Ausgangslinie und den Mutanten, sowie der Umstand, daß die Zellen vor der Selektion mutagenen Dosen an Gammastrahlung ausgesetzt worden waren, läßt einen mehr oder minder großen Verlust von chromosomalem Material vermuten.

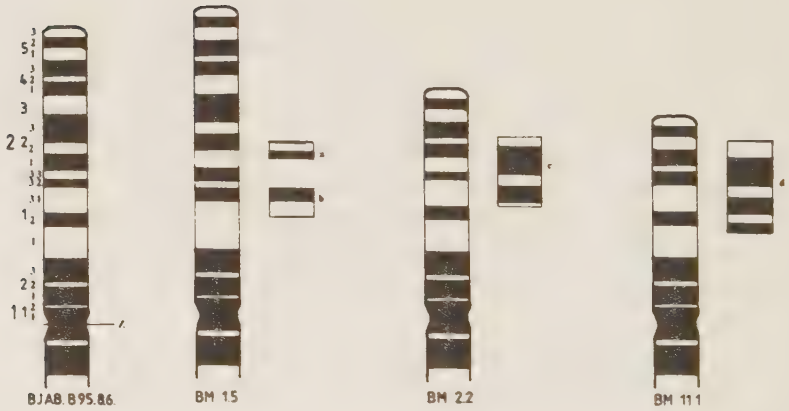
Zur Ermittlung solch möglicher mutativer Veränderungen im Bandenmuster des Chromosoms 6, wurden von den Mutanten BM1.5, BM2.2, BM5.2, BM10.1 und BM11.1, sowie der Parentallinie BJAB.B95.8.6 Chromosomenpräparate angefertigt.

Die Auswertung von jeweils mehreren hundert Mitosestadien ergab folgendes Bild: Der Wildtyp BJAB.B95.8.6 zeigte neben einer ganzen Anzahl chromosomaler Veränderungen gegenüber normalen menschlichen Zellen zwei unveränderte Chromosomen 6. Bei den Mutanten war nur noch ein unverändertes Chromosom zu erkennen. Das Zweite Chromosom der Mutanten BM1.5. BM5.2 und BM10.1 zeigte eine Deletion im Bereich 6p21.31 bis 6p21.33. Gleichzeitig war eine Duplikation der proximal zu dieser Deletion liegenden Banden 6p21.1 und 6p21.2 erfolgt. Bei der Mutante BM2.2 konnte der Bereich 6p21.33 bis 6p23.05 nicht mehr charakterisiert werden. Chromosomenbrüche im distalen Bereich der Banden 6p21.31 und 6p23.08 konnten bei der Mutanten BM11.1 gezeigt werden.

In Abbildung. 8 sind die veränderten Chromosomen dreier Mutanten im Vergleich zum unveränderten Wildtyp schematisch dargestellt.

Abbildung 8 Schematische Darstellung des kurzen Armes von Chromosom 6p von BJAB.B95.8.6 Zellen und dreier Mutanten.

BJAB.B95.8.6 : unverändertes Chromosom 6p bei Wildtypzellen.
BM1.5 : mit einer Deletion im Bereich 6p21.31 bis 21.33 (a) und einer Duplikation der Bande 6p21. 1 und 21.2 (b)
BM2.2 : mit einer Deletion von 6p 21.33 bis 23.05 (c)
BM11.1: mit einer Deletion von 6p21.31-bis 23.C8 (d)



3.2.6 Untersuchungen des Glyoxalase-Enzyms

Wie schon aus Abbildung 1 ersichtlich, liegt das Glyoxalase (GLO)-Gen proximal der HLA-Gene auf dem kurzen Arm von Chromosom 6. Um nun abzuklären, in wieweit das GLO-Gen von einem Mutationsereignis mit betroffen worden sein konnte, wurde die GLO-Aktivität in den Mutanten BM1.5, BM2.2, BM11.1 und in BJAB.B95.9.6 Zellen bestimmt. Die Wildtypzellen zeigten im Zymogramm den homozygoten Phänotypus GLO1. Die Aktivität der Genprodukte glo von BJAB.B95.8.6 Zellen wurde als 100% gesetzt und die jeweiligen Aktivitäten der Mutanten darauf bezogen. Es konnte keine Veränderung der GLO-Enzymaktivität bei den Mutanten BM2.2 und BM11.1 zum Wildtyp gefunden werden. Hingegen zeigte sich in mehreren unabhängigen Versuchen mit BM1.5 eine Erhöhung der Aktivität um 75%.

3.3 Herstellung und Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern gegen HLA-Antigene unter Verwendung der Wildtyplinie und zweier Mutanten

Durch die Befunde, daß sich die BJAB.B95.8.6 Zellen und die Mutanten in der Expression von nur wenigen Antigenen unterscheiden (siehe Tab. 6), ist ihr Einsatz zur gezielten Isolierung oder Herstellung von Reagenzien gegen bestimmte HLA-Antigene dieser Linien vielversprechend.

3.3.1 Herstellung monoklonaler Antikörper

Für die erste Fusion wurden zur Immunisierung von Mäusen Zellen des Klones BJAB.B95.8.6 verwendet. Etwa sechs Tage nach der Fusionierung von Lymphozyten der immunisierten Maus mit Myelomzellen und die Kultivierung im HAT-Selektionsmedium (2.1.8.2), waren in 72% der 24iger Schalen schnell wachsende Hybridzellen zu erkennen. Von diesen Zellen wurden 4-6 Tage später 105 verschiedene Kulturüberstände an den Zellinien BJAB.B95.8.6, BM1.5 und BM2.2 ausgetestet. Über die Zusetzung eines radioaktiv markierten anti-Maus Immunglobulins konnte dann im radioaktiven Bindungstest festgestellt werden, ob Antikörper aus den Überständen an die Zellen gebunden hatten (2.2.15). Nur zwei der getesteten Überstände die nach der späteren Klonierung und Reklonierung die Bezeichnung TÜ160 und TÜ161 erhielten, reagierten ausschließlich mit der Zellinie BJAB.B95.6. Die übrigen 103 Überstände enthielten entweder keine spezifischen Antikörper gegen die HLA-Determinanten dieser Linie (24), oder aber sie reagierten ohne Ausnahme mit allen drei Zelltypen (79). Da sich BM1.5 und BM2.2 zum Wildtyp offenbar gemeinsam dadurch unterscheiden, daß diese Mutanten HLA-A2, B13 und Bw4 nicht mehr exprimieren, war zu vermuten, daß TÜ160 und TÜ161 mit einem dieser Antigene reagiert.

Da entsprechende monoklonale Antikörper bereits zur Verfügung standen, (TÜ101, 110), wurde in einem zweiten Versuchsansatz mit der

Mutanten BM2.2 immunisiert, um von vornherein auszuschließen, daß die immunisierte Maus Antikörper gegen HLA-A2, B13 und Bw4 produzieren könnte.

Nach erfolgter Fusion der Lymphozyten mit den Myelomzellen wurden die Überstände der kultivierten Hybride an Zellen von BM2.2 und BM1.5 ausgetestet. Auch aus dieser Fusion (in ca. 70% aller Schalen wuchsen Hybride) reagierten zwei von 176 ausgetesteten Hybridüberständen ausschließlich mit BM2.2 und nicht mehr mit BM1.5 Zellen, wodurch vermutet werden konnte, daß diese Antikörper Antigene der Klasse II erkennen. Die restlichen Überstände zeigten entweder mit keiner der Mutanten BM1.5 und BM2.2 eine Reaktion (118) oder mit beiden (56). Nach Klonierung (0,2 Zellen/Schale) der beiden Hybridpopulationen, die ausschließlich mit der Mutanten BM2.2 reagierten, wurden die Überstände dieser Klone nochmals routinemäßig an den Mutanten im radioaktiven Bindungstest überprüft. Es zeigte sich jedoch, daß die Überstände aller Klone nicht mehr mit BM2.2 Zellen reagierten. Daraufhin wurden die eingefrorenen, noch unklonierten Zellen der beiden Hybride nochmals aufgetaut, sofort auf Schalen verteilt (5 Zellen/Schale) und die Überstände aller Hybridkolonien (ca. 30 Stück) nach einigen Tagen im radioaktiven Bindungstest an den Mutanten BM1.5, BM2.2, BM3.1, BM5.2 und BM7.4 getestet. Jedoch auch der Kulturüberstand dieser Hybride zeigte keinerlei Reaktion mehr mit den Zellen.

3.3.2 Charakterisierung der monoklonalen Antikörper

Zur eingehenden Charakterisierung der Spezifität von TÜ160 und TÜ161 wurden die Antikörper an einer ganzen Reihe von humanen Zellinien (siehe Tab.2) mit definierter HLA-Antigenexpression im radioaktiven Bindungstest erprobt (Tab. 8). Als Kontrollen wurden jeweils die monoklonalen Antikörper W6/32.HK und W6/32.HL eingesetzt. Übereinstimmend band TÜ160 an alle Zellen der Linien, die HLA-A2 positiv waren (z.B. SHOO, KR3598) und die sich gleichzeitig in der Expression von HLA-B und HLA-C Molekülen unterschieden. Der monoklonale

Antikörper TÜ161 ging einzig mit den Zellen NC-37, Bri-8, BJAB, BJAB.B95.8.6 und BJAB-HR1K eine Bindung ein. Alle diese Zellen waren für das Antigen HLA-B13 typisiert.

Da bekannt ist, daß Antikörper gegen HLA-A2 Determinanten überwiegend auch mit HLA-A28 Molekülen kreuzreagieren (Müller et al., 1983), wurde die Reaktion des monoklonalen Antikörpers TÜ160 an HLA-A2 oder -A28 positiven peripheren Blutlymphozyten (PBL) im CTX geprüft. Um sicherzustellen, daß der Antikörper auch bei geringer Antigendichte schwach kreuzreagierende Antigene noch registriert, wurde mit 1:10 verdünnter Aszitesflüssigkeit von TÜ160 gearbeitet. Im einzelnen sind die Reaktionen von TÜ160 mit PBL-Zellen in Tabelle 9 dargestellt. Der Antikörper reagierte mit allen 38 HLA-A2 exprimierenden Zellen, jedoch bei den HLA-A28 positiven PBL Zellen reagierte er nur mit 19 von 34 Zellen. Mit den restlichen 25 verschiiedenen Zellen die weder HLA-A2 noch A28 Antigene trugen, konnte mit TÜ160 keine Reaktion festgestellt werden. Diese Ergebnisse bewießen, daß der monoklonale Antikörper TÜ160 signifikant alle HLA-A2 Antigene, nicht jedoch alle HLA-A28 Moleküle erkennen konnte.

Unter den im radioaktiven Bindungstest eingesetzten humanen Zellinien waren nur vier HLA-B13 positive Linien vertreten. Deshalb erfolgte die Austestung des monoklonalen Antikörpers TÜ161 noch zusätzlich an einer akuten undifferenzierten Leukämiezelle (RH) im indirekten bakteriellen Bindungstest. Auf diesen Zellen wurden außer HLA-B13 keine weiteren HLA-B-Moleküle gefunden. Es zeigte sich, daß auf über 90% der Zellen unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers TÜ161 durchschnittlich 20-30 Bakterien binden konnten, während die Werte der Kontrollansätze für TÜ110 (HLA-B13) bei 10-20 Bakterien (auf 80% der Zellen) und für W6/32.HL (HLA-A, B, C) bei 30-50 Bakterien (auf 95% der Zellen) lagen. Die Ergebnisse mit dem monoklonalen Antikörper TÜ161 lassen vermuten, daß dieses Reagenz gegen HLA-B13 Determinanten gerichtet ist, obwohl die Anzahl der Zellen auf denen TÜ161 ausgetestet wurde bisher noch zu klein ist, um eine endgültige Beurteilung durchführen zu können.

Tabelle 8 Charakterisierung der Spezifität der monoklonalen Antikörper TÜ160 und TÜ161 im radioaktiven Bindungstest anhand von humanen Zellinien mit differenter HLA-Antigenexpression.

Zellinie	HLA-Phänotyp	Monoklonale Antikörper			
		W6/32.HL	W6/32.HK	TÜ160	TÜ161
Daudi	DRw6	1	1	1	1
EB-3	A3, BW6, Cw3	5	1	1	1
Namalwa	A3, A28, B7, Bw50, Bw4, Bw6, C-	8	1	1	1
NC-37	A3, B13, Bw22, Bw6, Cw5	13	1	1	4
H2LCL	A3, B7, Bw62, Bw6, D-	9	1	1	1
SHOO	A1, A2, B8, Bw44, Cw5	12	1	8	1
KR3598	A2, A2, Bw44, Bw44, Bw4, Bw4, C-	6	1	4	1
ERL	A3, Aw24, B7, B51, Bw4, Bw6, C-	13	1	1	1
1788	A2, A3, B7, Bw4, Bw6, C-	7	1	5	1
Bri-8	A1, A3, B13, Bw6, Cw1, Cw6	10	1	1	3
BRW	A1, A2, B7, B12, Bw4, Bw6, Cw2	16	1	16	1
8677	A1, A2, B8, B12, Bw4, Bw6, Cw5, Cw7	6	1	4	1
Priess	A2, Cw3	9	1	7	1
Molt-4	A1, A25, B-. C-	6	1	1	1
CCRF-CEM	A1, A11, Bw60, Bw6, C-	8	1	1	1
JMN	A1, A3, B7, Bw35, Bw6, Bw6, Cw4	11	1	1	1
1301	A1, Aw31, Bw35, Bw6, C-	11	1	1	1
Reh	Aw23, Aw32, Bw50, Bw51, Bw4, Bw6, C-	11	1	1	1
KM-3	Aw23, Aw32, Bw35, Bw6, Cw4	12	1	1	1
ML-1	A2, Aw30, B27, Bw53, Bw4 , Bw4, Cw3	5	1	5	1
HL-60	A1, B17, Bw4, C-	8	1	1	1
BJAB	A1, A2, B13, Bw35, Bw4, Bw6, Cw4	6	1	4	2
BJAB.B95.8	A1, A2, B13, Bw35, Bw4, Bw6, Cw4	11	1	8	4
BJAB.HR1K	A1, A2, B13, Bw35, Bw4, Bw6, Cw4	5	1	3	2
U937	A3, Aw19, B18, Bw35, Bw4, Bw6, Cw1	5	1	1	1

Die Werte geben das Verhältnis der gebundenen Aktivität gegenüber der negativen Kontrolle W6/32.HK an (cpm W6/32.HK ≙ 1).

Tabelle 9 Reaktivität des monoklonalen Antikörpers TÜ160 mit Lymphozyten (PBL) von 92 verschiedenen Spendern unter Verwendung von 1:10 verdünnter Aszitesflüssigkeit. Im Reaktionsschema ist die Anzahl der nach einem bestimmten Typ verlaufenenReaktion zwischen TÜ160 und den jeweiligen 92 PBL-Zellen dargestellt.

HLA-Antigene der PBL-Zellen	Reaktionsschema					
	+ +	+ -	- +	- -	**	***
A2	38	0	14	40	0,7	0,1
A28	19	15	33	25	0,01	-
A2/A28*	52	15	0	25	0,7	0,1

"++" Antigen positiv, Antikörperreaktion positiv
"+-" Antigen positiv, Antikörperreaktion negatiiv
"-+" Antigen negativ, Antikörperreaktion positiv
"--" Antigen negativ, Antikörperreaktion negativ
"ns" nicht signifikant
* Zellen positiv für HLA-A2 oder HLA-A28
** Korrelationskoeffizient
*** Irrtumswahrscheinlichkeit

3.3.2.1 Bestimmung der Immunglobulinklassen von TÜ160 und TÜ161

Zur Ermittlung der Immunglobulinklassen von TÜ160 und TÜ161 wurden die Antikörper mit 14-C-Lysin markiert und auf einem Lämmli-Gel unter reduzierten Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt. Auf der Autoradiographie (Abb. 9) konnte im Vergleich zu bereits definierten Kontrollreagenzien (W6/32.HL=IgG und TÜ99=IgM) festgestellt werden, daß die Antikörper TÜ160 und 161 der IgG-Klasse zuzuordnen waren.

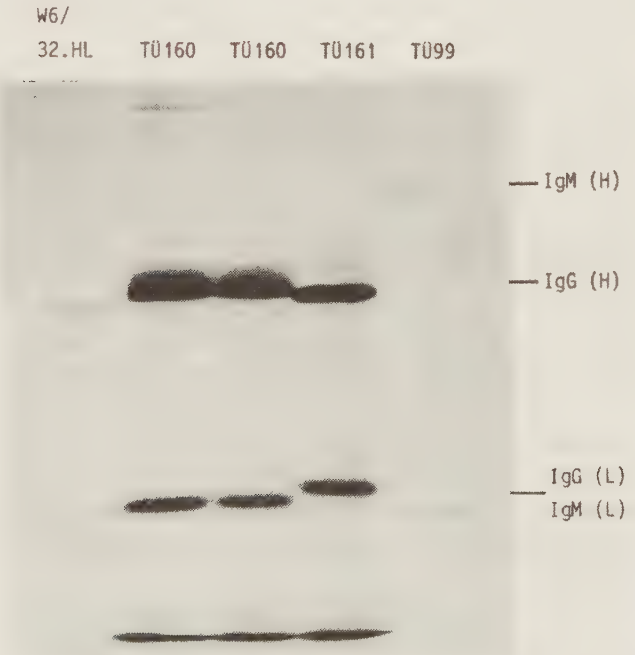


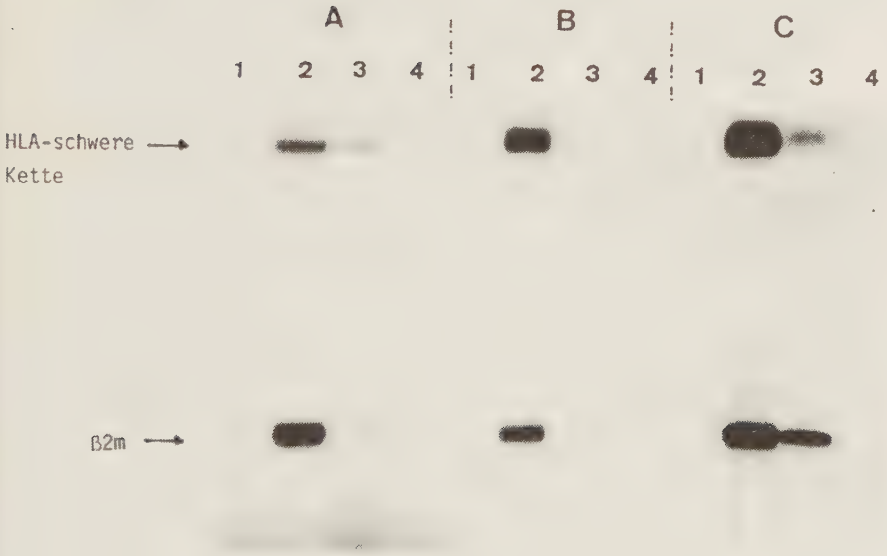
Abbildung 9 Auftrennung der markierten monoklonalen Antikörper TÜ160 und TÜ161 auf einem SDS-PAGE nach Lämmli unter reduzierten Bedingungen (Gelkonzentration 10%, Fluorographie 2 Tage auf Fuji Rx-Film). Als Kontrolle wurde W6/32.HL (IgG) und TÜ99 (IgM) eingesetzt. H = schwere Kette; L = leichte Kette der Immunglobuline

3.3.2.2 Biochemische Einsetzbarkeit der Antikörper bei Immunpräzipitationen.

Durch den Einsatz von bestimmten Antikörpern ist es möglich, ganz gezielt spezifische Antigene aus einer Zellmembranfraktion zu isolieren. Der Antikörper bindet an das Antigen und dieser Komplex kann wiederum über die Kopplung an Staphylococcus aureus isoliert werden. Die Möglichkeit Antigene zu präzipitieren ist jedoch nicht mit allen Antikörpern möglich. Ob dies nun an der Avidität,d.h. an der Bindungsstärke der Immunglobuline zum entsprechenden Antigen liegt, oder an anderen noch nicht definierten Faktoren ist unklar.

Um die monoklonalen Antikörper TÜ160 und TÜ161 daraufhin zu untersuchen, wurde mit drei radioaktiv markierten (125I) humanen Zellinien Immunpräzipitation mit den monoklonalen Antikörpern W6/32.HL, TÜ160, TÜ161 und W6/32.HK als Kontrollreagenz durchgeführt (siehe 2.2.18). Die Auftrennung der Proben erfolgte mittels SDS-PAGE. Das Ergebnis der Autoradiographie (Abb. 10) demonstrierte, daß mit beiden Antikörpern die Antigene HLA-A2 und -B13 präzipitiert werden konnten. Sowohl bei der Linie BOB als auch bei BJAB.B95.8.6 -beide Linien HLA-A2 positiv- konnte mit TÜ160 eine schwere Kette sowie ß2m präzipitiert werden. In der Spur des Präzipitates von TÜ161 mit dem Wildtyp Zell-Lysat waren ebenfalls die zwei für Klasse I charakteristischen Banden zu erkennen. Die Linie U937 wurde als negative K ontrolle herangezogen, da die Zellen weder für HLA-A2 noch für -B13 typisiert werden konnten. Erwartungsgemäß konnten nur mit W6/32.HL Proteine aus dem Lysat präzipitiert werden, nicht jedoch mit TÜ160 und TÜ161.

Abbildung 10 Auftrennung von Immunpräzipitaten unter reduzierten Bedingungen mittels SDS-PAGE (Gelkonzentration 10%, 125-I, Autoradiographie 1 Tag auf Fuji Rx-Film).
In den Sektionen A-C sind die Präzipitate der Linien BJAB. B95.8.6 (HLA-A1, A2, B13, Bw35), U937 (HLA-A3, Aw19, B18, Bw38) und BOB (HLA-A2, A2, Bw62, Bw62) mit den jeweils verwendeten monoklonalen Antikörpern W6/32.HK (Spur 1), W6/32.HL (Spur 2), TÜ160 (Spur 3) und TÜ161 (Spur 4) aufgetragen.



Faßt man alle Daten über die hergestellten und soweit charakterisierten monoklonalen Antikörper zusammen, so folgt: TÜ160 und TÜ161 konnten durch den Einsatz von mutierten Zellen im HLA-Bereich als HLA Klasse I spezifische Reagenzien aus einer Vielzahl von Antikörpern definiert werden. Die anschließende Charakterisierung zeigte, daß der monoklonale Antikörper TÜ160 spezifisch HLA-A2 Antigene erkennt, der IgG-Klasse angehört, Komplement fixiert und für Immunpräzipitationen eingesetzt werden kann. TÜ161 hingegen reagiert offenbar spezifisch mit HLA-B13 Molekülen, ist ein IgG, bindet nicht Komplement, ist jedoch für die Präzipitation von HLA-B13 Antigenen aus Zell-Lysaten geeignet.

3.4 Biochemische Charakterisierung von BJAB.B95.8.6 und BM2.2 Zellen mit dem monoklonalen Antikörper TÜ160 und TÜ161 als auch mit Reagenzien gegen Klasse II-Antigene

Mit Hilfe der nun zur Verfügung stehenden monoklonalen Antikörper TÜ160 und TÜ161 sollte versucht werden, den biochemischen Beweis für des Fehlen der Antigene HLA-A2 und B13 auf der Mutante BM2.2 und ihr Vorhandensein auf Wildtypzellen zu erbringen. Bis jetzt konnte dieser Versuch nicht ausgeführt werden, da keine zur Immunpräzipitationen einsetzbaren monoklonalen Antikörper dieser Spezifität zur Verfügung standen.

Es wurden die Zellen der Linien BJAB.B95.8.6 und BM2.2 mit 35-S-Methionin intern markiert (siehe 2.2.16). Die Präzipitationen von Antigenen beider Zellinien erfolgte sequenziell mit den monoklonlen Antikörpern W6/32.HK (als negative Kontrolle), TÜ161, TÜ160 und W6/32.HL. Jeweils die Hälfte der Proben wurde zur vollständigen Eliminierung aller Neuraminsäuremoleküle, die an den schweren Ketten der Klasse I Moleküle in variablen Mengen gebunden sind, einer Neuraminidasebehandlung unterzogen.

In den ersten sieben Spuren des in Abb. 11 gezeigten Gels wurden die Präzipitate der BJAB.B95.8.6 Zellinie aufgetrennt, wobei die ersten vier nicht mit Neuraminidase behandelt worden waren. Die anderen sieben

Spuren zeigen die Immunpräzipitate der Mutante BM2.2 ebenfalls ohne und mit Neuraminidasebehandlung. Ein Vergleich der unterschiedlich behandelten Proben zeigt, daß eine Verringerung der Bandenanzahl nach Behandlung mit Neuraminidase eingetreten war und der Isoelektrische Punkt der Moleküle höher lag. Aus diesen Beobachtungen heraus wurden nur die Spuren mit Neuraminidase-behandelten Proben für die Auswertung berücksichtigt.

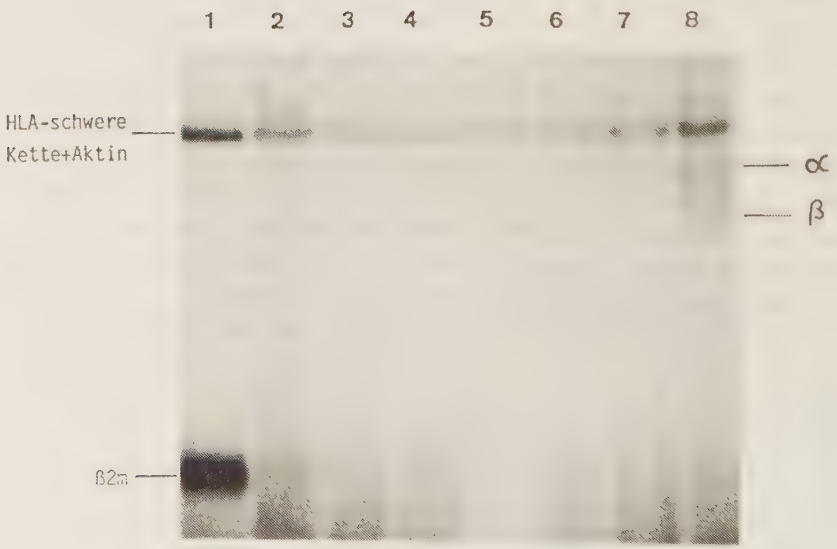
Ein Vergleich der Präzipitate von verschiedenen monoklonalen Antikörpern ergab folgendes Bild: Mit dem Antikörper TÜ160 und TÜ161 konnten ausschließlich aus dem Zell-Lysat des Wildtyps Proteine gebunden und präzipitiert werden (Spur 5,6), nicht bei BM2.2 (Spur 12, 13). Die Präzipitation von HLA-A2 Molekülen aus dem Zell-Lysat von BJAB.B95.8.6 war so erfolgreich, daß bei der nachfolgenden Behandlung des Lysats mit dem Antikörper W6/32.HL die Bande dieser HLA-Produkte fehlte (Spur 7). Anders verhielt es sich bei dem Antikörper TÜ161. Nur ein Bruchteil der HLA-B13 Moleküle wurden von diesem Antikörper präzipitiert (Spur 6). Der überwiegende Teil konnte mit W6/32.HL isoliert werden, was anhand der Intensität der Bande klar zum Ausdruck kommt. Ein zusätzlicher Hinweis in diese Richtung liegt im Fehlen dieser Bande bei der Mutante BM2.2 im Präzipitat mit W6/32.HL (Spur 14). Somit konnten erstmals die HLA-A2 und HLA-B13 Antigene der BJAB.B95.8.6 Zellinie definierten Banden in der IEF zugeordnet werden. Um welche HLA-Produkte es sich bei den beiden Banden, die sowohl bei BJAB.B95.8.6 Zellen als auch bei der Mutante im Präzipitat von W6/32.HL auftraten handelt, ist noch unklar. Es können sowohl die Antigene HLA-A1, Bw35 oder auch Bw6 sein. Die letzte Bande in allen Spuren, in denen Klasse I-Antigene präzipitiert worden waren, war das ß2-Mikroglobulin. Teilweise auftretende unspezifische Bindungen an den Bakterien-Antikörperkomplex konnten durch die Verwendung von W6/32.HK dargestellt und bei der Auswertung berücksichtigt werden.

Abbildung 11 Auftrennung von 35-S-Methionin markierten Proben in der IEF.
Sequenzielle Immunpräzipitationen wurden mit vier verschiedenen monoklonalen Antikörpern (W6/32.HK: Spur 1,8; W6/32.HL: Spur 2,7,9,14; TÜ160: Spur 3,5,10,12; TÜ161: Spur 4,6,11,13) an den mit 35-S-Methionin markierten Zellinien BJAB.B95.8.6 (Sektion A) und BM2.2 (Sektion B) ausgeführt. Die Hälfte jedes Präzipitates wurde mit Neuraminidase vorbehandelt, um die Neuraminsäuremoleküle abzuspalten.
"-" Proben wurden nicht mit Neuraminidase behandelt
"+" Proben wurden mit Neuraminidase behandelt.
◄ HLA-B13; ← HLA-A2; ◁ HLA-A1?, Bw35?, Bw6?; ★ ß2m

Die Mutanten unterscheiden sich jedoch nicht nur hinsichtlich ihrer Klasse I-Antigene sondern auch in der Expression von Klasse II. Deshalb sollten in nachfolgenden Versuchen die Klasse II Antigene der BJAB.B95.8.6 Zellinie und zweier, in der Expression von HLA-D Antigenen unterschiedlicher Mutanten dargestellt werden. In einem ersten Schritt wurden die BJAB.B95.8.6 Zellen mit dem Isotop 125-J extern markiert, die Zellen lysiert und mit den monoklonalen Antikörpern NDS 15.38, BT3/4, 7.3.19.1, IVD12, SFR5-DR5, TÜ22 und TÜ39 Immunpräzipitationen durchgeführt. Die Auftrennung der Proben erfolgte auf einem 10%igen SDS-Gel.

Nachdem das Gel 2 Wochen auf einem radiosensitiven Film exponiert wurde, konnte in zwei von acht Spuren (4 und 8) eine verstärkte Präzipitation je einer alpha und eine beta-Kette nachgewiesen werden (Abb. 12). Es handelte sich um die Präzipitate mit den Antikörpern 7.3.19.1 (HLA-MT2) und TÜ39 (HLA-DR und SB). Bei den übrigen Reagenzien, die spezifisch mit HLA-DR2, DC1, DC, DR5 und MB3 Antigenen reagierten, waren keine oder nur sehr schwache Banden zu erkennen. Die Gründe, für die teilweise erfolglose Immunpräzipitation der 5 Antigene sind möglicherweise in einer zu geringen Menge an Klasse II Molekülen auf der Zellmembran zu suchen. Ferner kann die Avidität einiger Antikörper zu den Antigenen zu schwach für eine Präzipitation des Antigen-Antikörperkomplexes gewesen sein. Von weiteren Immunpräzipitationen mit den Mutanten wurde daher abgesehen.

Abbildung 12 Immunpräzipitationen eines 125-I markierten BJAB.B95.8.6 Zell-Lysates mit monoklonalen Antikörpern gegen Klasse II Antigene. Die präzipitierbaren Proteine mit den jeweils eingesetzten monoklonalen Antikörpern 1) SFR8-B6 2) NDS 15.38 3) BT3/4 4) 7.3.19.1 5) TÜ22 6) SFR5-DR5 7) IVD12 8) TÜ39 wurden auf einem 10%-igen SDS-PAGE aufgetrennt und 5 Tage auf einem Fuji Rx-Film autoradiographiert.



4. Diskussion

Durch die Fortschritte auf dem Gebiet der Zellkultivierung erweiterten sich auch die Möglichkeiten der immunologischen Grundlagenforschung . Die Kultivierbarkeit von Zellen mit bestimmten Funktionen durch Transformation oder durch Fusionierung mit Tumorzellen erleichterte die Erforschung zahlreicher Fragestellungen, da die Untersuchungen nun nicht mehr am gesamten Organismus sondern an einzelnen Zellen erfolgen konnten. Nachdem die ersten spontan auftretenden HLA-Mutanten in humanan Zellkulturen isoliert und charakterisiert werden konnten (Pious et al., 1973; Pious und Soderland, 1974), versuchte man gezielt an Zellen Veränderungen im HLA-Komplex herbeizuführen (Pious et al., 1977; Kavathas et al., 1980).

In der hier vorliegenden Arbeit sollten mit Hilfe von Gammastrahlung Mutationen in humanen Zellen erzeugt werden und dabei auftretende Zellen mit veränderter HLA-Expression mittels eines geeigneten Selektionsverfahrens isoliert und anschließend charakterisiert werden. Voraussetzung hierfür war die Wahl einer geeigneten Ausgangslinie, die leicht zu klonieren und zumindest für einen HLA-Locus heterozygot sein sollte. Unter den Zellinien SK-1, ERL, BJAB, BJAB.B95.8, BJAB-HR1K, 8677 und MS8482 hat sich die BJAB.B95.8 Linie am geeignetsten für diese Problemstellung erwiesen. Die Linie zeigt eine hohe Klonierungseffizienz sowie Heterozygotie für alle definierbaren HLA-Molekule. Gemäß den Untersuchungen von Klein und Mitarbeitern, (1976) exprimieren die Zellen der Linie BJAB.B95.8 die HLA-Antigene A1, A2, B13, Bw4 und BW6. Dies trifft auch für den zu Beginn der Experimente hergestellten Klon BJAB.B95.8.6 dieser Linie zu (Typisierungsergebnisse in den nachfolgenden Abschnitten dargestellt).

4.1 Herstellung von HLA-Mutanten

Zur Erhöhung der Mutationsrate bei Organismen oder Zellkulturen sind seit langem die beiden Verfahren der Induktion durch chemische Mutagene und durch Bestrahlung bekannt. Die Behandlung der BJAB.B95.8.6 Zellen mit dem chemischen Mutagen Äthylmethansulfonat, dessen Anwendung für die Herstellung humaner HLA-Mutanten erstmals von Pious und Mitarbeitern, (1977) beschrieben wurde, war für die Zellinie jedoch äußerst toxisch (Resultate nicht dargestellt). Schon in einer Konzentration von unter 100 µg/ml wurden die Zellen so geschädigt, daß sie sich nach einiger Zeit nicht mehr teilten. Daher wurde von weiteren Experimenten mit diesem chemischem Mutagen Abstand genommen.

Wie Abrahamson, (1976) zeigte, lassen sich durch die Anwendung von Gamma-Strahlen bei Chromosomen Deletionen verschiedensten Ausmaßes erzeugen. Die in Abb. 3 und 4 dargestellten Dosis-Wirkungsversuche an BJAB.B95.8.6 Zellen zeigen ähnlich wie schon bei Kavathas und Mitarbeitern, (1980), daß bei diesem Verfahren ein Kompromiß zwischen der Erhöhung der Mutationsraten und der Verringerung der Überlebenschance der Zellpopulation durch steigende Strahlendosis gefunden werden muß. Eine Erhöhung der Dosis auf mehr als 3 Gy verminderte die Zellproliferation von BJAB.B95.8.6 Zellen derart, daß eine Kultivierung solcher Zellen auf Dauer nicht mehr möglich war. Sämtliche Bestrahlungsexperimente wurden daher mit 3Gy durchgeführt.

Die Selektion möglicher Mutanten in einer bestrahlten Zellpopulation kann durch Eliminierung der nicht mutierten Zellen über eine Komplement-Bindungsreaktion erfolgen, wie dies von Kavathas und Mitarbeitern, (1980) für LCL-721 Zellen beschrieben ist. Durch zytotoxische Antikörper, die spezifisch an Oberflächenstrukturen von Zellen binden, kann die Lyse der Zellen nach der Zugabe von Komplement erfolgen. Nur jene Zellen, an die keine Antikörper binden können -weil das entsprechende Antigen nicht exprimiert ist- überleben in diesem Testsystem. Eine wichtige Voraussetzung für diese Art der Selektion von Zellen ist, daß im Komplement keine mit den Zellen unspezifisch reagierenden Komponenten enthalten sind. In den entsprechenden

Kontrollversuchen (3.1.3) konnte jedoch gezeigt werden, daß eine unspezifische Lyse der Zellen auftrat. Dies konnte jedoch durch entsprechende Absorption des Komplements an Zellen der Ausgangszellinie behoben werden. Selektionen, die entweder nur unter Zusetzung von einem oder zwei HLA-spezifischen monolkonalen Antikörpern zu bestrahlten BJAB.B95.8.6 Zellen erfolgten, führten zu keiner Isolierung von HLA-phänotypisch veränderten Zellen. Die Gründe dafür können in der zellzyklusabhängigen Expression der Antigene, der möglichen Ablösung des Antigen-Antikörper-Komplexes von der Zellmembran (Bach und Chaterioud, 1984), der quantitativ geringen Präsenz der Determinanten, oder aber in der zu geringen Affinität der Antikörper zu den Determinanten liegen. Diese Selektionsdaten stehen im Widerspruch zu denen mehrerer Arbeitsgruppen (Kavathas et al., 1980; Krangel et al., 1982; Pious et al., 1982 ; DeMars et al., 1983a), die sowohl mit nur einem monoklonalen Antikörper, als auch mit einem Alloantiserum HLA-Mutanten isolieren konnten. Erst die Selektion mit einem Gemisch aus drei monoklonalen Antikörpern (TÜ48, 101, 109), die mit den Produkten zweier unterschiedlicher Loci reagieren (HLA-A, B), brachte Zellen hervor, die ein differentes Reaktionsverhalten gegenüber den Wildtypzellen im indirekten bakteriellen Bindungstest aufwiesen. Die Überprüfung der insgesamt 15 voneinender unabhängig gewachsenen, aus einer Selektion hervorgegangenen Zellpopulationen (BM1-BM15) ergab, daß keiner der zur Selektion eingesetzten monoklonalen Antikörper an die Zellen binden konnte. Darüberhinaus zeigte der in 3.1.4 dargestellte Versuch, daß auch der nicht zur Selektion benutzte monoklonale Antikörper TÜ110 (HLA-B13) nicht mehr mit den BM-Zellen reagierte. Damit konnte nachgewiesen werden, daß sich die selektionierten Zellen wenigstens in den Klasse I-Antigenen HLA-A2, B13 und Bw4 von der Ausgangslinie unterscheiden.

Für eine genaue Charakterisierung der Zellen ist die Herstellung genetisch einheitlichen Ausgangsmaterials notwendig, d.h., die selektionierten Zellpopulationen mußten einer Klonierung unterzogen werden.

In Abänderung zu früheren Arbeiten (Pious et al., 1973; Sugden und Mark, 1977) erfolgte die Kultivierung und Klonierung der BJAB.B95.8.6 -Mutanten nicht mehr mit der Agarosetechnik, sondern durch Kultivierung der Zellen mit zuvor bestrahlten Makrophagen (als Füllerzellen) in Mikrotiterplatten. Der Vorteil dieser Methode besteht einerseits in einem geringeren Materialaufwand, und außerdem wird eine sonst notwendige kurzzeitige Temperaturerhöhung (41°C) der Zellsuspension vermieden. Alle 15 isolierten Zellen konnten auf diese Weise ohne Verluste kloniert und in Kultur genommen werden (Stammbezeichnung BM1-BM15, Nummer des Klons nach Punkt, z.B. BM1.5).

4.2 Charakterisierung der Mutanten

Obwohl die Selektion ausschließlich mit Klasse I erkennenden Reagenzien durchgeführt wurde, erfolgte die Charakterisierung der BM-Klone im direkten bakteriellen Bindungstest sowohl mit Klasse I als auch mit Klasse II spezifischen monoklonalen Antikörpern, da größere Verluste von HLA-Antigenen nicht ausgeschlossen werden konnten.

Im bakteriellen Bindungstest (Uchanska-Ziegler et al., 1982; Ziegler et al., 1982) ist es nicht nur möglich, Informationen über die Expression von Antigenen und deren Quantität, sondern auch über den generellen Zustand der Zellen zu bekommen. Von Vorteil in diesem Test war, daß die Zellen IgM und nicht IgG- Moleküle auf der Zellmembran trugen , da es bei der Expression von zuletzt genannten Immunglobulinen leicht zu unspezifischen Reaktionen mit den Bakterien kommen kann (Sandrini et al., 1978). Bei den klonierten Mutanten konnte wie zuvor bei den 15 unklonierten Zellpopulationen die Abwesenheit von HLA-A2, B13 und Bw4-Molekülen demonstriert werden (Tab. 4). Durch den Verlust dieser Antigene ist zu erklären, daß bei den Mutanten die Anzahl der gebundenen Bakterien mit dem monoklonalen Antikörper W6/32. HL (HLA-A, B, C), um bis zu 30% im Vergleich zum Wildtyp reduziert war.

Mit dem monoklonalen Antikörper SFR8-B6 konnte nach der Selektion erstmals gezeigt werden, daß HLA-Bw6 Moleküle gleichermaßen auf BJAB.B95.8.6 Zellen und Mutanten vorhanden waren.

Ein unerwartetes Ergebnis zeigen die Untersuchungen der Mutanten für den HLA-Bw4 spezifischen monoklonalen Antikörper TÜ109. Obwohl dieser monoklonale Antikörper zur Selektion der Mutanten eingesetzt worden war und er im indirekten bakteriellen Bindungstest nicht mit den Mutanten reagierte (Tab. 3), ging er im direkten bakteriellen Bindungstest eine Bindung mit den Mutanten ein (Tab. 4). Die Menge der gebundenen Bakterien an den Mutanten im Vergleich zu den Wildtypzellen war allerdings deutlich reduziert (ca. 50%). Eine Erklärung für dieses differente Verhalten von TÜ109 könnte in der Bindung des Antikörpers an das Bakterium und einer daraus resultierenden Steigerung der Avidität des Antikörpers zum Bw4-Moleküls im direkten bakteriellen Bindungstest liegen. Da jedoch der ebenfalls für HLA-Bw4 spezifische monoklonale Antikörper TÜ48 keine Reaktion mit den Mutanten zeigte, muß angenommen werden, daß TÜ109 noch eine weitere Spezifität aufweist.

Bei den Klasse II Antigenen war in diesem Versuch einzig mit dem Antikörper YD1/63.HLK eine deutliche Reduktion in der Bindung der Bakterien an die Mutanten zu verzeichnen. Bis jetzt ist über die Spezifität des Antikörpers nur bekannt, daß er in Abhängigkeit vom HLA-Haplotyp eine Subpopulation von HLA-DR und SB Molekülen erkennt (Shaw et al., 1984; Ziegler et al., 1984). Bei den übrigen Klasse II Antikörpern waren ansonsten keine auffällig unterschiedlichen Reaktionen mit den Mutanten im Vergleich zum Wildtyp zu erkennen.

Durch die Bestimmung der HLA-Antigenexpression über die direkt meßbare Bindung von radioaktiv markierten Antikörpern an Zellen wurde versucht, die Daten vom direkten bakteriellen Bindungstest zu verifizieren. Diese Versuche wurden stellvertretend an den Mutanten BM1.5 und BM2.2 durchgeführt. Der Vorteil dieser Methode im Vergleich zum bakteriellen Bindungstest besteht in der direkten Meßbarkeit der Bindung des Antikörpers an das Antigen . Von Vorteil ist ferner, daß die Zellzahl, sowie die Anzahl der Proben erheblich erhöht werden kann, was wiederum die statistische Auswertung verbessert.

Sowohl mit dem monoklonalen Antikörper, der spezifisch HLA-A, B, C-Moleküle erkennt (W6/32.HL), als auch mit Reagenzien, die spezifisch an ß2-Microglobulin binden (Tü99, 100), war eine Verringerung der Klasse I Antigene gegenüber den Wildtypzellen zu erkennen. Die Reduktion der Bindung belief sich mit dem Antikörper W6/32.HL bei beiden Muta nten auf 35-42%. Mit den monoklonalen Antikörpern TÜ99 und TÜ100 war ein Rückgang der Bindung von 12% und 34% bei BM1.5 Zellen bzw. 44% und 62% bei BM2.2 Zellen zu bemerken. Gladstone und Mitarbeiter, (1982) fanden bei Untersuchungen an hergestellten Mutanten der humanen Ausgangslinie T5-1 eine Verringerung der Klasse I Antigene um 20-25%. Ihre Folgerung, daß dies nicht auf ein mitotisches "Crossing-Over", sondern auf ein Deletionsereignis zurückzuführen sein konnte, muß danach auch für die BM-Mutanten angenommen werden. Ansonsten wäre zumindest quantitativ keine Reduktion der Klasse I-Antigenexpression um nahezu 40% zu erklären. Dies bedeutet gleichzeitig, daß die Zellen auf den durch Deletion eingetretenen Verlust einzelner Antigene nicht mit einer verstärkten Produktion der noch verbliebenen Antigenstrukturen reagiert. D.h. eine Kompensation findet nicht oder zumindest nicht in erheblichem Umfang statt.

Entsprechende Untersuchungen der Klasse II-Antigene erweiterten die Resultate des bakteriellen Bindungstests. Die quantitative Analyse der Antigenexpression zeigte für die Mutante BM1.5 und BM2.2 eine um 77% verringerte Bindung des Antikörpers YD1/63.HLK sowie eine um 15% und 48% verringerte Bindung des Antikörpers TÜ34 gegenüber der Wildtyplinie (Abb. 7). Mit den Antikörpern TÜ36 und TÜ37 reagierten BM1.5 Zellen wie BJAB.B95.8.6 Zellen, während BM2.2 eine Verringerung um ca. 27% erkennen ließ. Entsprechen die Resultate mit YD1/63.HLK den Erwartungen aus dem bakteriellen Bindungstest, so zeigen die Reaktionen mit TÜ34, 36 und TÜ37 noch zusätzliche Unterschiede der Mutanten BM1.5 und BM2.2 zur Ausgangslinie, sowie Differenzen innerhalb der Mutanten selbst. Eine weitergehende Interpretation dieses Befundes kann jedoch nicht vorgenommen werden, da die Antikörper TÜ34 und TÜ36 lediglich als

DR-spezifisch, TÜ37 und YD1/63.HLK noch zusätzlich als SB-spezifisch definiert sind (Shaw et al., 1984; Ziegler et al., 1984).

Nachdem in den vorangegangenen Abschnitten der Nachweis für eine erfolgreiche Mutagenese und Selektion von Zellen der BJAB.B95.8.6 Linie erbracht werden konnte, soll im Folgenden eine genaue Charakterisierung der durch Mutation entstandenen Veränderungen im HLA-Bereich dargestellt werden. Hierzu war zunächst die vollständige Typisierung der Ausgangslinie BJAB.B95.8.6 notwendig. Die Bestimmung der gesamten HLA-Antigene sowohl der Parentallinie, als auch der 15 klonierten Mutanten wurde mit Hilfe des Mikrozytotoxizitätstests sowie CML-Studien durchgeführt. Für die BJAB.B95.8.6 Zellinie ergibt sich daraus folgender HLA-Typ: A1, A2, B13, Bw35, Bw4, Bw6, Cw4, DR5, MT1/MB1, MT2, MB3, SB2 und SB4. Das 2. HLA-DR Allel konnte nicht eindeutig bestimmt werden. Die Zellen reagierten sowohl mit DRw10 als auch mit DR2 Alloantikörpern. Da es sich bei den anti DRw10 Reagenzien jedoch um Alloantiseren und nicht um einen monoklonalen Antikörper, wie bei dem anti-DR2 Reagenz (NDS.15.38) handelt, liegt die Vermutung nahe, daß die Alloantiseren noch weitere Antikörper enthalten, die mit anderen Oberflächenstrukturen auf den Zellen reagieren. Dafür spricht auch, daß die anti-DRw10 Seren mit den gesamten Mutanten reagierten, während NDS.15.38 (HLA-DR2) ausschließlich die Mutanten BM2.2, BM3.1, BM4.1, BM12.1, BM13.1 und BM14.1 erkannte (Ziegler pers. Mitteilung). Mit Alloantiseren konnte dieses Ergebnis jedoch nicht reproduziert werden.

Eindeutige Unterschiede der Mutanten zur Wildtyplinie in der Expression von Klasse I Antigenen konnte durch die MT1/MB1 erkennenden Alloantiseren nachgewiesen werden (Tab. 6). Alle bereits mit Anti-DR2 reagierenden Zellen waren auch für MT1/MB1 positiv. Während sich bei den Klasse II Antigenen HLA-DR5, MT2, MB3 und SB4 keine Unterschiede zur BJAB.B95.8.6 Linie zeigten, reagierten die 11 getesteten Mutanten negativ gegen SB2 spezifische Reagenzien.

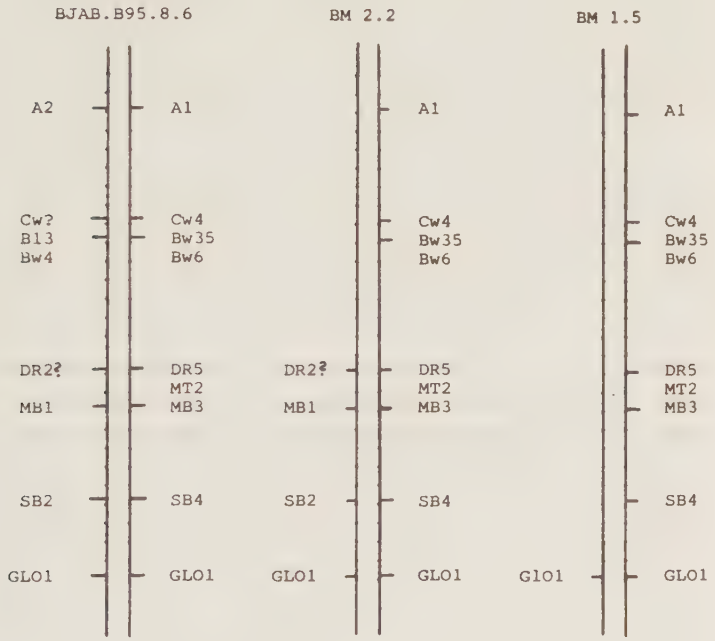
Die Typisierung der Klasse I Antigene ergab für alle 15 Mutanten den bereits aus den Resultaten des bakteriellen Bindungstestes zu erwartenden Verlust von HLA-A2, B13 und Bw4 Antigenen. Weitere

Unterschiede zur Ausgangslinie traten bei den Klasse I-Antigenen A1, Bw35, Bw6 und Cw4 nicht auf. Zusammenfassend lassen sich also die Mutanten anhand der Typisierungsergebnisse in drei Gruppen mit verschiedenem Phänotyp einteilen: Die erste Gruppe exprimiert keine HLA-A2, B13 und Bw4 Moleküle (Klasse I) mehr, jedoch noch die gesamten Klasse II Antigene. Die 2. Gruppe zeigt neben dem Verlust der Klasse I-Antigene HLA-A2, B13 und Bw4 noch die Abwesenheit der Klasse II-Antigene DR2? und MT1/MB1, während die 3. Gruppe außer HLA-A2, B13, Bw4, DR2?, MT1/MB1 auch noch HLA-SB2 verloren hat.

Anhand dieser Ergebnisse kann nun erstmals auf die Haplotypen der BJAB.B95.8.6 Zellinie rückgeschlossen werden. So müssen auf dem einem Chromosom 6 die Gene für HLA-A1, Bw35, Bw6, Cw4, DR5, MT2, MB3 und SB4, auf dem anderen die Gene für HLA-A2, B13, Bw4, DR2?, MT1/MB1 und SB2 liegen (Abb. 13).

Es war anzunehmen, daß derart umfangreiche phänotypische Veränderungen, wie sie bei den Mutanten auftraten,auf größere im Genom der Zellen sichtbare Veränderungen zurückzuführen sein mußten. Tatsächlich konnten bei fünf untersuchten Mutanten Veränderungen im kurzen Arm von Chromosom 6 festgestellt werden (Abb. 8; 3.2.5).Je eines der Chromosomen 6 der Mutanten BM 1.5, BM5.2 und BM10.1 ließ eine Deletion im Bereich 6p21.31 bis 6p21.33 und eine Duplikation im Segment 6p21. 1 und 6p21. 2 erkennen, während die Mutante BM 2.2 eine Deletion von 6p21.33 bis 6p23.05 in kurzen Arm aufwies. Bei der Mutante BM11.1 wurden Chromosomenbrüche im distalen Bereich der Banden 6p21.31 und 6p23.08 festgestellt. Der Mechanismus, der zu den zytogenetischen Veränderungen der Zellen BM2.2 und BM11.1 führte,ist vermutlich ein einfacher Stückverlust von chormosomalem Material. Bei BM1.5, BM5.2 und BM10.1 hingegen ist neben einem Stückverlust ein ungleiches "Crossing Over" oder eine Translokation zwischen den homologen Chromosomen 6 eingetreten (Fonatsch, Spring, Ziegler; Manuskript in Bearbeitung). Bisherige klinische und zellgenetische Studien grenzen den Ort der HLA-Gene auf 6p21-6p22, möglicherweise 6p21.3 ein (Francke and Pellegrino, 1977; Berger et al., 1979; Ferrando et al., 1980; Goodfellow et al., 1982; Morton et al., 1982; Sachs et al., 1983).

Abbildung 13 HLA-Haplotypen der Linien BJAB.B95.8.6, BM2.2 und BM1.5.



Anhand der vorliegenden zytogenetischen Daten und den Charakterisierungsergebnissen der Mutanten kann jedoch der Ort der Klasse I Gene noch genauer, nämlich in der Bande 6p21.33 lokalisiert werden. Die Gene für die Klasse II Antigene DR2? und MT1/MB1 müssen proximal der Deletion bei BM2.2, in den Banden 6p21.31 und 6p21.32 liegen (vergl. HLA-Phänotyp in Tab. 6).

Bei den Untersuchungen der GLO-Enzymaktivität von Mutanten konnte die Arbeitsgruppe von Gladstone, (1982) den Ort des GLO-Genes in den Chromosomenabschnitten 6p21.2 und 6p21.3 lokalisieren, also in unmittelbarer Nachbarschaft zur Duplikation in den Mutanten BM1.5, BM5.2 und BM10.1. Daher mußte untersucht werden, in wiefern das zentromer zum HLA-Komplexes gelegene GLO-Gen in die Mutationen einbezogen worden war. Es konnte gezeigt werden, daß die Zellinie BJAB.B95.8.6 für GLO homozygot ist und daß die Enzymaktivitäten mit denen der Mutanten BM2.2 und BM11.1 ungefähr gleich waren. Eine deutliche Steigerung um 50-100% war jedoch bei BM1.5 festzustellen. Das Ergebnis ist in Übereinstimmung mit den zytogenetischen Daten einer Duplikation des Bereiches 6p21.1-6p21.2 und grenzt den Ort des GLO-Gens somit auf die Banden 6p21.1 und 6p21.2 ein. Vergleicht man die Daten von Gladstone und Mitarbeitern, (1982), die dieses Gen den Banden 6p21.2 und 6p21.3 zugeordnet haben, so kann die genaue Lokalisierung im Überschneidungsbereich beider Ergebnisse, also in 6p21.2 angenommen werden.

4.3 Verwendungsmöglichkeiten der Mutanten

Mutanten mit Verlusten von Genen des MHC konnten für Kartierungsstudien (Kavathas et al., 1980; Orr und DeMars, 1983), zur Gewinnung von DNA-Fragmenten bzw. zur Spezifizierung solcher Nukleinsäuren (Orr and DeMars, 1983), sowie zur Bestimmung der Spezifität monoklonaler Antikörper gegen Produkte der Klasse II Gene eingesetzt werden (Shaw et al., im Druck). Die in dieser Arbeit hergestellten und charakterisierten Mutanten sind darüberhinaus noch

für andere Bereiche einsetzbar. Sie können zum Beispiel wie homozygote humane Linien (für bestimmte Antigene) zur Präparation von zellulären Reagenzien (Reinsmoen et al., 1977), als Standard für das Austesten von HLA-Antiseren, oder für die Herstellung und Charakterisierung von Hybridüberständen verwendet werden, was im letzten Teil dieser Arbeit dargestellt werden soll.

Die Tatsache nutzend, daß die Mutanten sich in der Expression von HLA-Antigenen untereinander und im Vergleich zum Wildtyp unterscheiden, konnten aus einer großen Anzahl antikörpersezernierender Hybridzellen gezielt HLA-Determinanten erkennende Antikörper ermittelt werden. Wie in Abschnitt 3.3.1 dargestellt, wurde sowohl die Ausgangslinie BJAB.B95.8.6 sowie Zellen der Mutante BM2.2 zur Immunisierung von Mäusen eingesetzt. Aus der Fusion der Lymphozyten dieser Mäuse mit Myelomzellen konnten in beiden Fällen erfolgreich Hybride kultiviert werden, die spezifisch Antikörper gegen Strukturen der als Immunogen eingesetzten humanen Zellen sezernierten. Aufgrund der genau bekannten Unterschiede in der Expression der HLA-Antigene zwischen BJAB.B95.8.6 Zellen und den Mutanten BM1.5 und BM2.2 war die Möglichkeit gegeben, ohne die sonst üblichen langwierigen "Screening-Verfahren" die Spezifität bestimmter Antikörper zu ermitteln. Dies bedeutet beispielsweise, daß ein gegen das Immunogen BJAB.B95.8.6 gerichteter Antikörper, der die Mutante BM2.2 nicht mehr erkennt, in seiner Spezifität auf die HLA-Antigene A2, B13 und Bw4 beschränkt sein muß. Reagiert er mit BM2.2 Zellen, aber nicht mehr mit BM1.5 so ist von einer Spezifität gegen die Klasse II-Antigene DR2?, MT1/MB1 und SB2 auszugehen.

Die aus den beiden Fusionen hervorgegangenen Hybridzellen behielten jedoch nur in einem Fall ihre Fähigkeit, Antikörper zu sezernieren auch nach der Klonierung bei. Die Überprüfung der Hybridüberstände führte zur Isolierung der beiden monoklonalen Antikörper TÜ160 und TÜ161.

Da beide Antikörper nicht mehr mit den Mutanten reagierten, wohl aber mit der Ausgangslinie BJAB.B95.8.6 konnte von einer Spezifität gegen die Klasse I Antigene HLA-A2, B13 oder Bw4 ausgegangen werden. Da eine weitere Eingrenzung der Spezifität mit Mutanten nicht möglich war, wurden die beiden Antikörper an einer Reihe ausgewählter humaner Zellinien mit definierter HLA-Antigenexpression ausgetestet (Tab. 8). Alle HLA-A2 tragenden Zellen reagierten mit TÜ160, wohingegen TÜ161 die HLA-B13 positiven Zellen erkannte. In früheren Arbeiten (Lopez de Castro et al., 1982; Müller et al., 1983a) wurden bereits mehrfach Kreuzreaktionen von HLA-A2 spezifischen Antikörpern mit HLA-A28 Antigenen beschrieben. Dies wird auf die nur geringfügige Varianz einiger Aminosäuren im Aufbau der schweren Kette beider Antigene zurückgeführt. Aus diesem Grunde wurde der HLA-A2 spezifische monoklonale Antikörper an einer Rheie von periphären Blutlymphozyten (PBL) mit verschiedener HLA-A2 und A28 Antigenexpression erprobt (Tab. 9). Während ausnahmslos alle HLA-A2 positiven Zellen erkannt wurden, konnte jedoch nur bei der Hälfte der HLA-A28 positiven PBL-Zellen eine Lyse beobachtet werden. Dies bedeutet, daß TÜ160 nur bestimmte HLA-A28 Varianten erkennt. Die Durchführung dieser Untersuchungen im Mikrozytotoxizitätstest zeigten, daß TÜ160 fähig war Komplement zu fixieren. Dies ermöglicht im Gegensatz zum nicht zytotoxischen monoklonalen Antikörper TÜ161 die Verwendung von TÜ160 in der HLA-Typisierung.

Über die elektrophoretische Auftrennung der Antikörperproteine in Abbildung 9 konnte gezeigt werden, daß beide Antikörper zur IgG-Klasse gehören. Die Versuche im Abschnitt 3.2.2.4 zeigten, daß sowohl TÜ160 als auch TÜ161 in der Lage waren, HLA-A2 bzw. HLA-B13 Moleküle von BJAB.B95.8.6 und BOB Zellen zu binden und mittels anti-Maus beschichteten Bakterien zu präzipitieren (Abb. 10). Damit standen erstmals Reagenzien zur Verfügung, die zur biochemischen Charakterisierung von der Mutanten BM2.2 und BJAB.B95.8.6 Zellen eingesetzt werden konnten. Die Proteinauftrennung präzipitierter HLA-Antigene über das Verfahren der Isoelektrischen Fokusierung zeigte für die Mutante BM2.2 das eindeutige Fehlen zweier Proteinbanden, die

bei der Ausgangslinie mit den monoklonalen Antikörpern TÜ160 und TÜ161 präzipitiert werden konnten (Abb.11). Somit gelang es, den biochemischen Beweis für die Abwesenheit der HLA-A2 und B13 Determinanten auf der Mutante BM2.2 zu erbringen. Darüberhinaus war erstmals die zweifelsfreie Zuordnung zweier elektrophoretisch aufgetrennter Proteinbanden im Gesamtpräzipitat der Klasse I Antigene möglich.

5. Zusammenfassung

Durch die Behandlung mit Gammastsahlen konnten an Zellen der humanen Zellinie BJAB.B95.8.6 Mutationen ausgelöst werden, die zum Verlust der Expression bestimmter HLA-Antigene führten. Derartig phänotypisch veränderte Zellen ließen sich unter Anwendung einer Mischung definierter monoklonaler Antikörper über eine Komplement-Bindungsreaktion gezielt aus der Zellpopulation selektionieren. Auf diese Weise konnten 15 verschiedene HLA-Mutanten (BM1-BM15) der Linie BJAB.B95.8.6 isoliert, dauerhaft kultiviert und kloniert werden. Die unterschiedlichen Linien wurden mit verschiedenen serologischen, funktionellen, enzymatischen und biochemischen Methoden im Hinblick auf ihr genotypisches und phänotypisches HLA-Muster untersucht. Die Charakterisierung läßt sich wie folgt zusammenfassen: Die Mutanten können in drei Gruppen mit unterschiedlich großen Verlusten an HLA-Antigenen eingeteilt werden.

a) Alle 15 Mutanten sind bezüglich der Determinanten HLA-A2, B13 und Bw4 negativ.
b) 9 Mutanten haben zusätzlich noch HLA-DR2? und MT1/MB1 verloren (BM1.5, BM5.2, BM6.3, BM7.4, BM8.5, BM9.1, BM10.1, BM11.1, BM15.3).
c) Bei den Mutanten BM1.5, BM7.4, BM10.1 und BM15.3 ist auch das HLA-SB2 Antigen nicht mehr nachweisbar.

Daraus ergeben sich für die Ausgangslinie BJAB.B95.8.6 folgende, erstmals ermittelten Haplotypen: HLA-A1, Bw35, Bw6, Cw4, DR5, MT2, MB3, SB4 und HLA-A2, B13, Bw4, DR2?, MT1/MB1, SB2.

Zytogenetische Untersuchungen an 5 ausgewählten Mutanten (BM1.5, BM2.2, BM5.2, BM10.1, BM11.1) ermöglichten eine genotypische Zuordnung der zuvor phänotypisch nachgewiesenen Veränderungen . Die Mutante BM2.2 z.B. (negativ für HLA-A2, B13, Bw4) zeigte eine Deletion von 6p21.33-6p23.05. Bei BM1.5 (negativ für HLA-A2, B13, Bw4, DR2?, MT1/MB1, SB2) tritt neben einer Deletion im Bereich 6p21.31-6p.21.33 zusätzlich eine Duplikation in den Regionen 6p21.1 und 6p21.2 auf. Bei BM11.1 (negativ für HLA-A2, B13, Bw4, DR2?, MT1/MB1) fehlte das Stück 6p21.31-6p23.08. Anhand dieser Daten konnten die HLA-A, B und C Gene

der Bande 6p21.33 und die Gene für HLA-DR2? und MT1/MB1 den Banden 6p21.31 und 6p21.32 zugeordnet werden. Aufgrund quantitativer GLO-Enzymstudien konnte ein Übergreifen der Duplikation bei der Mutanten BM1.5 auf den Bereich des GLO-Genes ermittelt werden. Durch diese Untersuchungen und durch Vergleiche mit anderen Ergebnissen konnte das GLO-Gen in der Bande 6p21.2 lokalisiert werden.

Am Beispiel der Herstellung und Typisierung von monoklonalen HLA-Antikörpern wurden praktische Anwendungsmöglichkeiten für definierte HLA-Mutanten aufgezeigt. Über die Ausgangslinie BJAB.B95.8.6 konnten zwei neue Antikörper (TÜ160, TÜ161) hergestellt, isoliert und charakterisiert werden. Die Antikörper TO160 und TÜ161 sind spezifisch für HLA-A2 bzw. HLA-B13 Antigene. Sie gehören beide zu IgG-Klasse und können für Immunpräzipitationen eingesetzt werden. Im Gegensatz zu TÜ161 kann TÜ160 Komplement fixieren und ist somit im Mikrozytotoxizitätstest einsetzbar.

Mit Hilfe dieser beiden neuen monoklonalen Antikörper konnte der biochemische Nachweis für das Fehlen von HLA-A2 und B13 Molekülen auf BM2.2 Zellen nachgewiesen werden. Damit war ferner erstmals die Zuordnung zweier Klasse I Antigene im Bandenmuster elektrophoretischer Proteinauftrennung von BJAB.B95.8.6 Zellen gelungen.

Die Verwendung von definierten HLA-Mutanten zur Typisierung von Antikörpern stellt dabei eine große Arbeitserleichterung gegenüber den bisher üblichen Typisierungsmethoden dar. In Zukunft kann der direkte Einsatz von spezifischen HLA-Mutanten als Immunogene zu einer weiteren Vereinfachung bei der gezielten Antikörperproduktion führen, womit nicht nur Fortschritte in der HLA-Grundlagenforschung erreicht, sondern auch schnellere und besser abgesicherte Ergebnisse im klinischen Anwendungsbereich erzielt werden können.

Abrahamson,S. und Wolff, S.: Re-analysis of radiation-induced specific locus mutations in the mouse. Nature, 264: 715-719, 1976

Adams, R. A., Pothier, L., Flowers, A., Lazarus, H., Faber, S. und Foley, G. E. : The question of stemlines in human acute leukemia. Exp. Cell Res. 62:5-10, 1970

Adams, R. A., Pothier, L., Hellerstein, E. E. und Boileau, G. : Malignant immunoblastoma-immunoglobulin-synthesis and progression to leukemia in heterotransplanted acute lymphoblastic leukemia, chronic lymphatic leukemia, lymphoma and infectious mononucleosis. Cancer. 31:1397-1407, 1973

Algranati, I. D., Milstein, C. und Ziegler, A.: Studies on biosynthesis, assembly and expression of human major transplantation antigens. Eur. J. Biochem. 103:179-207, 1980

Allen, F. H.: Linkage of HLA and GBG. Vox Sang. (Basel), 27:382-384, 1974

Bach, F. H. und Voynow, N. K.: One-way stimmulation in mixed leukocyte cultures. Science. 153:545-547, 1966

Bach, F. H., Valentine, E. A., Alter, B. J., Svejgaard, A. und Thomsen, M.: Typing for HLA-D: primed LD typing and homozygous typing cells. Tissue Antigens. 8:151-155, 1976

Bach, J. F. und Chatenoud, L.: Antigenic modulation-a major mechanism of antibody action. Immunology Today. 5:20-25,1966

Bain, B., Vas, M. R. und Lowenstein, L.: The development of large immature mononuclear cells in mixed leukocyte culture. Blood. 23:108, 1964

Barnstable, C. J., Bodmer, W. F., Brown, G., Galfre, G., Milstein, C., Williams, A. F. und Ziegler,A.: Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens-new tools for genetic analysis. Cell, 14:9-20, 1978

Beckman, I. G. R., Bradley, J., Macardle, P. J., Wolnizer, C. M. und Zola, H.: A hybridoma monoclonal antibody which reacts with cells carrying the HLA-A2 antigen: evidence for heterogeneity in the expression of HLA-A2. Tissue Antigens. 18:341-348, 1981

Berger, R., Bernheim, A., Sasportes, M., Hauptmann, G., Hors, J., Legrand, L. und Fellous, M.: Regional mapping of the HLA on the short arm of chromosome 6. Genetics, 15:245-251, (1979)

Bodmer, J. G.: Ia antigens. Brit. Med. Bull. 34:233-240, 1978

Bourel, D., Fauchet, R. und Genetet, B.:Anti-HLA A2 + A28 monoclonal antibody.Tissue Antigens, im Druck

Brodsky, F. M., Parham, P., Barnstable, C. J., Crumpton, M. J. und Bodmer, W. F.: Monoclonal antibodies for analysis of the HLA-System. Immunol.Rev. 47:3-61, 1979

Brodsky, F. M. und Parham, P.: Evolution of HLA antigenic determinants: species cross-reaction of monoclonal antibodies. Immunogenetics. 15:151-166, 1982

Ceppellini, R. und Van Rood, J. J.: The HL-A system. I. Genetics and molecular biology. Seminars in Hematology. 11:233-251, 1974

Ceppellini, R., Curtoni, E. S., Mattiuz, P. L., Miggiano, V., Scudeller, G. und Serra, A.: Genetics of leukozyte antigens. A family study of segregation and linkage. Histocompatibility Testing 1967. Munksgaard, Kopenhagen, pp:149-187, 1967

Ceppellini, R., Bonnard, G. D., Coppo, F., Miggiano, V. C., Pospisil, M., Curtoni, E. S. und Pellegrino, M.: Mixed leukozyte cultures and HL-A antigens.I. Reactivity of joung fetuses, newborns and mothers at delivery. Transpl. Proc. 3:58-70, 1971

Coligan, J. E., Kindt, T. J., Uehara, H., Martinko, J. und Nathenson, S. G.: Primary structure of a murine transplantation antigen. Nature 291:35-39, 1981

Corte, G., Calabi, F., Damiani, G., Bargellesi, A., Tosi, R und Sorrentino, R.: Human Ia molecules carrying DC1 determinants differ in both alph and beta- subunits from Ia molecules carryind DR determinants. Nature. 292:357-360, 1981

Cowan, N. J., Secher, D. S. und Milstein, C. : Intracellular immunoglobulin chain synthesis in non-secreting variants of a mouse myeloma: Detection of inaktive light chain messenger RNA. J. Mol. Biol. 90:679-701, 1974

Cushley, W und Owen, M.J.: Structural and genetic similarities between immunoglobulins and class I histocompatibility antigens. Immunology Today, 4:88-92, 1983

Dausset, J.: Leuco-agglutinins. IV. Leuco-agglutinins and blood transfusion. Vox. Sang. (Basel). 4:190-198, 1954

Dausset, J.: Iso-leuco-anticorps. Acta heamat. (Basel). 20:156-166, 1958

Dausset, J., Ivanyi, P. und Ivanyi, D.: Tissue alloantigens in human: identification of a complex system (Hu-I). Histocompatibility Testing 1965. Munksgaard, Kopenhagen. pp:51-62, 1965

DeMars, R., Chang, C. C. und Rudersdorf R. A.: Dissection of the D-region of the human major histocompatibility complex by means of induced mutations in a lymphoblastoid cell line. Human Immunology, 8:123-139, 1983a

DeMars, R., Chang, C. C., Marrari, M., Duquesnoy, R. J., Noreen,H., Segall, M. und Bach, F. H.: Dissociation in expression of MB1/MT1 and DR1 alloantigens in mutants of a lymphoblastoid cell line. J. Immunol. 131:1318-1321, 1983b

Duquesnoy, R. J., Marrari, M. und Annen, K.: Identification of an HLA-DR-associated system of B-cell alloantigens. Transpl. Proc. 11:1757-1760, 1979

Epstein, M. A., Barr, Y., Achong, B. G. : Studies with Burkitt's lymphoma. Wistar Inst. Symp. Monogr. 4:69-82, 1965

Erlich, H. A., Stetler, D., Saiki, R., Gladstone, P. und Pious, D.: Mapping of the genes encoding the HLA-DR alpha-chain and the HLA-related antigens to a chromosome 6 deletion by using genomic blotting. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80:2300-2304, 1983

Ferguson, W. S., Terhorst, C. T., Robb, R. und Strominger, J. L.: Localization of the disulfide bridges of human histocompatibility antigens. Mol. Immunol. 16:23-28, 1979

Ferrando, P., San Roman, C., De Cordoba, S. R. und Arnaiz-Villena, A.: Partial trisomy 6p: 46,XX,-10, der (10), t(6;10) (p22;q26) pat and HLA localisation. Case reposts. 231-234, 1980

Fonatsch, C., Schaadt, M., Kirchner, H. und Diehl, V.: A possible correlation between the degree of karyotype aberrations and the rate of sister chromatid exchanges in lymphoma lines. Int. J. Cancer. 26: 749-756, 1980

Forley, G. E., Lazarus, H., Faber, S., Uzman, B. G., Boone, B. A. und McCarthy, R. E. : Continious culture of human lymphoblasts from preipheral blood of a child with acut leukemia. Cancer. 18:522-529, 1965

Fradelizi, D. und Dausset, J.: Mixed lymphocyte reactivity of human lymphocytes primed in vitro. I. Secondary response to allogenetic lymphocytes. Euro. J. Immunol. 5:295-301, 1975

Francke, U. und Pellegrino, M. A.: Assignment of the major histocompatibility complex to a region of the short arm of human chromosome 6. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74:1147-1151, 1977

Fresen, K. O. und zur Hausen, H. : Establishment of EBNA-expressing cell lines by infection of Epstein-Barr virus (EBV)-genome-negative human lymphoma cells with different EBV strains. Int. J. Cancer. 17:161-166, 1976

Fu, S. M., Kunkel, H. G., Brusman, H. P., Allen, F. H. und Fohino, M.: Evidence for linkage between HL-A histocompatibility genes and those involved in the synthesis of the second component of complement. J. exp. Med. 140:1108-1111, 1974

Fuggle, S. V., Kirkley, J., Ting, A. und Morris, P. J.: A monoclonal antibody recognizing HLA-DR2 on malignant and activated cells. Immunogenetics,im Druck, 1984

Fujioka, S. und Gallo, R. C. : Aminoacyl transfer RNA profiles in human myeloma cells. Blood. 38:246-262, 1971

Galfré, G., Howe, S. C., Milstein, C., Butcher, G. W. und Howard, J.C. : Antibodies to major histokompatibility antigens produced by hybrid cell lines. Nature. 266:550-552, 1977

Gallagher, R., Collins, S., Trujillo, J., McCredie, K., Ahearn, M., Tsai, S., Metzgar, R., Aulakh, G., Ting, R., Ruscetti, F. und Gallo, R. : Charakterisation of the continous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. Blood 54:713-733, 1979

Germain, R. N. und Benacerraf, B.: A single major pathway of T-lymphocyte interactions in antigen-specific immune suppression. Scand J. Immunol. 13:1-10, 1981

Giles, R. C., Nunez, G., Hurley, N. C. K., Nunez-Roldan, A., Winchester, R., Stastny, P. und Capra, J. D. : Structural analysis of a human Ia homologue using a monoclonal antibody that recognizes an MB3-like specificity. J. Exp. Med. 157:1461-1470, 1983

Gladstone, P., Fueresz, L. und Pious, D.: Gene dosage and gene expression in the HLA region: evidence from deletion variants.Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79:1235-1239, 1982

Goodfellow, P. N., Jones, E. A., Van Heyningen, V., Solomon, E., Bobrow, M., Miggiano, V. und Bodmer, W. F.: The ß2 microglobulin gene is on chromosome 15 and not in the HLA region. Nature. 245:267-269, 1975

Goodfellow, P. N., Banting, G., Trowdale, J., Chambers, S und Solomon, E.: Introduction of a human X-6 translocation chromosome into a mouse teratocarcinoma: investigation of control of HLA-A, B, C expression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79:1190-1194, 1982

Heinrichs, H., Wernet, P. und Ziegler, A. : Expression of major histokompatibility antigens on human thymocytes studied using monoclonal antibodies. Immunogenetics. 11:629-635, 1980

Hirschhorn, K., Bach, F., Kolodny, R. L. und Firschen, I. L.: Immune response and mitosis of human peripheral blood lymphocytes in vitro. Science. 142:1185, 1963

Kaufmann, J. F., Auffray, C., Korman, A. J., Shackelford, D. A. und Strominger, J.: The class II molecules of the human and murine major histocompatibility complex. Cell. 36:1-13, 1984

Kavathas, P., Bach, F. H. und DeMars, R.: Gamma ray-induced loss of expression of HLA and glyoxalase I alleles in lymphoblastoid cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77:4251-4255, 1980

Kavathas, P., DeMars, R., Bach, F. H. und Shaw, S.: SB:a new HLA-linked human histocompatibility gene defined using HLA-mutant cell lines. Nature. 293:747-749, 1981

Kissmeyer-Nielsen, F., Svejgaard, A., Ahrons, S. und Straub-Nielsen, L.: Crossing-over within the HL-A system. Nature. 224:75-76, 1969

Kissmeyer-Nielsen, F.,Svejgaard, A., Freiesleben-Sorensen, S., Straub-Nielsen, L. und Thorsby, E.: Mixed lymphocyte cultures and HL-A identity in unrelated subjects. Nature. 228:63-65, 1970

Klein, E., Klein, G., Nadkarni, J. S., Nadkarni, J. J., Wigzell, H. und Clifford, P. : Surface IgM-kappa specificity on a Burkitt lymphoma cell in vivo and in derived culture lines. Cancer Res. 28:1300-1310, 1968

Klein, G., Zeuthen, J., Terasaki, P., Billing, R., Honig, R., Jondal, M., Westman, A. und Clements, G. : Inducibility of the Epstein-Barr virus (EBV) cycle and surface marker properties of EBV-negative lymphoma lines and their in vitro EBV-converted sublines. Int. J. Cancer. 18:639-652, 1976

Knapp, W.: Leukemia Merkers. Academic Press London, New York, Toronto, Sydney, San Franzisko, 1981

Köhler, G.: Frequency of precursor cells against the enzyme ß-galactosidase. An estimate of the BALB/c strain antibody repertoire. Eur. J. Immunol. 6:340-347, 1976

Köhler, G. und Milstein, C.: Continuos cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature. 256:495-497, 1975

Kömpf, J., Bissbort, S., Gussmann, S. und Ritter, H.: Polymorphism of red cell glyoxalase I (E.C.:4.4.1.5.). A new genetic marker in man. Humangenetik. 27:141-143, 1975

Koning, F., Schreuder, I., Giphart, M. und Bruning, H.: A mouse monoclonal antibody detecting a DR-related MT2-like specificity: serology and biochemistry. Human Immunology. 9:221-230, 1984

Krangel, M. S., Pious, D. und Strominger, J. L.: Human histocompatibiliy antigen mutants immunselected in vitro. J. Biol. Chem. 257:5296-5305, 1982

Krangel, M. S., Taketani, S., Pious, D. und Strominger, J. L.:HLA-A2 mutants immunselected in vitro. J. Exp. Med. 157:324-336,1983

Kratzin, H., Yang, C., Götz, H., Pauly, E., Kölbel, S., Egert, G., Thinnes, F. P., Wernet, P., Altevogt, P. und Hilschmann, N.: Primärstruktur menschlicher Histokompatibilitätsantigene der Klasse II. Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 362:1665-1674, 1981

Lämmli, U. K.: Cleavage of struktural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685, 1970

Levy, R., Dilley, J., Fox, R. I. und Warnke, R.: A human thymus-leukemia antigen defined by hybridoma monoclonal antibodies. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76:6552-6556, 1979

Littlefield, J. W. : Selection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants. Science. 145:709-710, 1964

Loosmore, S., Gladstone, P., Pious, D., Jerry, L., M. und Tamaoki, T.:Control of HLA-DR antigen gene expression at the pretranslational level: comparison of an HLA-DR-positive B lymphoblastoid cell line and its HLA-DR-negative variant. Immunogenetics. 15:139-150, 1982

Lopez de Castro, J. A., Strominger, J. L., Strong, D. M. und Orr, H. T.: Structure of crossreactive human histocompatibility antigens HLA-A28 and HLA-A2: possible implication for the generation of HLA polymorphism. Proc. Natl. acad. Sci. USA. 79:3813-3817, 1982

Lozzio, C. B. und Lozzio, B. B. : Human chronic myelogenous leukemia cell line with positive Philadelphia chromosom. Blood. 45:321-334, 1975

Mauff, G., Bender, K. und Fischer, B.: Genetic polymorphism of the fourth component of human complement. Vox. Sang. 34:296-301, 1978

Marchalonis, J. J., Vasta, G. R., Warr, G. W. und Baker, W. C.: Probing the boundaries of the extended immunoglobulin family of recognition molecules: jumping domains, convergence and minigenes. Immunology Today. 5:133-142, 1984

Mawas, C., Charmot, D., Sivy, M., Mercier, P., North, M. L. und Hauptmann, G.: A week human MLR locus mapping at the right of a crossing -over between HLA-D, Bf and GLO. Immunogenet. 5:383-395, 1978

Mayr, W.: Die Genetik des HLA-Systems. Populations-und Familienuntersuchungen unter besonderer Berücksichtigung der Paternitätsserologie. Humangenetik. 12:195-243, 1971

Mayr, W. R., Bernoco, D., DeMarchi, M. und Ceppellini, R.: Genetic analysis and biological properties of products of the third SD (AJ) locus of the HL-A region. Transpl. Proc. 5:1581-1593, 1973

Mempel, W., Albert, E. und Burger, A.: Further evidence for a separate MLC-locus. Tissue Antigens. 2:250-254, 1972

Menezes, J., Leibold, W., Klein, G und Clements, G.: Establishment and characterization of an Epstein-Barr virus (EBV) negative lymphoblastoid B-cell line (BJA-B) from an expectional, EBV-genome negative African Burkitt's lymphoma. Biomedicine. 22:276-284, 1975

Mempel, W., Grosse-Wilde, H., Baumann, P., Netzel, B., Steinbauer-Rosenthal, I., Scholz, S., Bertrams, J. und Albert, E. D.: Population genetics of the MLC response: typing for MLC determinants using homozygous and heterozygous reference cells. Transpl. Proc. 5:1529-1538, 1973

Meo, T., Atkinson, J., Bernoco, M., Bernoco, D. und Ceppellini, R.: Mapping of the HLA locus controlling C2 structural variants and linkage disequilibrium between alleles C2 and Bw. 15. Eur. J. Immunol. 6:916-919, 1976

Minowada, J.: Marker profiles of leukemia-lymphoma cell lines. In: Modern Trends in Human Leukemia IV. Springer Verlag Berlin, Heidelberg. 323-325, 1981

Minowada, J., Ohnuma, T. und Moore, G. E. : Rossette-forming human lymphoid cell lines I. Establishment and evidence for origin of thymus-derived lymphocytes. J. Natl. Canc. Inst. 49:891-895, 1972

Morton, C. C., Brown, J. A., Evans, G. A., Nance, W. E., Mohanakumar, T. und Kirsch, I. R.: Detection and localization of an extra HLA locus in a karyotypically normal male by chromosomal in situ hybridization. Am. J. hum. Genet. 34:136A, 1982

Müller, C., Ziegler. A., Müller, G., Schunter, F. und Wernet, P. : A monoclonal antibody (TÜ48) defining alloantigenic class I determinants specific for HLA-Bw4 and HLA-Aw23, -Aw24 as well as -Aw32. Human Immunology. 5:269-281, 1982

Müller, C., Herbst, H., Ziegler, A. und Wernet, P.: A cytotoxic monoclonal antibody specific for the privat alloantigenic determinant of the HLA-B13 molecule. Human Immunology. 7:229-237, 1983b

Müller, C., Shi, L., Schneider, M., Ziegler, A. und Wernet, P.: A cytotoxic monoclonal IgM antibody (TÜ101) directed against an antigenic determinant shared between the HLA-A allospecificities A2 and A28. Human Immunology. 5:189-197, 1983a

Nakamuro, K., Tanigaki, N. und Pressman, D.: Multiple common properties of human ß2-microglobulin and the common portion fragment derived from HL-A antigen molecules. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 70:2863-2865, 1973

O'Neill, G. J., Yang, S. Y., Tegoli, J., Berger, R. und Dupont, B.: Chido and Rodgers blood groups are distinct antigenic components of human complement C4. Nature. 273:668-670, 1978

Olaisen, B., Teisberg, P., Gedde-Dahl, T. Jr., Thorsby, E. und Jonassen, R.: Mapping of the HLA region genes by the haplotype method. Report of the committee on the genetic constitution of chromosome 6. siehe Robson und Lamm, 1984

Orr, H. T., Bach, F. H., Ploegh, H. L., Strominger, J. L., Kavathas, P. und DeMars, R.: Use of HLA-loss mutants to analyse the structure of the human major histocompatibility complex. Nature. 296:454-456, 1982

Orr, H. T. und DeMars, R. : Class I-like HLA genes map telomeric to the HLA-A2 locus in human cells. Nature. 302:534-536, 1983a

Orr, H. T. und DeMars, R.: Mapping of class I DNA sequences within the human major histocompatibility complex. Immunogenetics. 18:489-502, 1983b

Parham, P. und Bodmer, W. F.: Monoclonal antibody to a human histocompatibility alloantigen, HLA-A2. Nature. 276:397-398, 1979

Park M. S., Terasaki, P. I., Bernoco, D. und Ywaki, Y.: Evidence for a second B-cell locus separate from the DR locus. Transpl. Proc. 10:823-828, 1978

Pawelec, G., Blaurock, M., Schneider, E. M., Shaw, S. und Wernet, P.: Alloactivated long-term cultured human T lymphocytes express both HLA-DR and SB antigens but lack lymphocyte stimulation capacity. Eur. J. Immunol. 12:967-972, 1982

Pawelec, G., P., Shaw, S., Ziegler, A., Müller, C. und Wernet, P.:Differential inhibition of HLA-D-or SB-directed secondary lymphoproliferative responses with monoclonal antibodies detecting human Ia-like determinants. J. Immunol. 129:1070-1075, 1982

Payne, R. und Rolfs, M. R.: Fetomaternal leukocyte incompatibility. J. clin. Invest. 37:1756-1763, 1958

Peterson, P. A., Cunningham, B. A., Berggard, I. und Edelmann, G. M.: ß2-microglobulin-a free immunoglobulin domain. Proc. Nat. Acad. USA. 69:1697-1701, 1972

Pink, J. R. und Ziegler, A.: Radiolabeling and immunoprecipitation of cell-surface macromolecules. Immunological Methods. 10:169-179, 1979

Pious, D., Hawley, P. und Forrest, G.:Isolation and characterization of HL-A variants in cultured human lymphoplastoid cells. Proc. Natl.Sci. U.S.A. 70:1397-1400, 1973

Pious, D. und Soderland, C.:Expression of new antigens by HL-A variants of cultured lyphoid cells.J. Immunol. 113:1399-1404, 1974

Pious, D. und Soderland, C.: HLA-variants of cultured human lymphoid cells: evidence for mutational origin and estimation of mutation rate. Science. 197:769-771, 1977a

Pious, D., Soderland, C. und Gladstone, P.:Induction of HLA-mutations by chemical mutagens in human lymphoid cells. Immunogenetics. 4:437-448, 1977b

Pious, D., Krangel, M. S., Dixon, L. L., Parham, P. und Strominger, J. L.: HLA antigen structural gene mutants selected with an allospecific monoclonal antibody. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79:7832-7836, 1982

Ploegh, H. L., Cannon, L. E. und Strominger, J. L.: Cell-free translation of the mRNAs for the heavy and light chains of HLA-A and HLA-B antigens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76:2273-2277, 1979

Ploegh, H. L., Orr, H. T. und Strominger, J. L.: Major histocompatibility antigens: The human (HLA-A, -B, C) and murine (H-2K, H-2D) class I molecules. Cell. 24:287-299, 1981

Potter, M.: Immunglobulin-producing tumor and myeloma proteins of mice. Physiol. Rev. 52:631-719, 1972

Radka, S. F., Kostyu, D. D. und Amos, D. B.: A monoclonal antibody directed against the HLA-Bw6 epitope. J.Immunol. 128:2804-2806, 1982

Reedman, B. M. und Klein, G. : Cellular localization of an Epstein-Barr virus (EBV)-associated complement-fixing antigen in producer and non-producer lymphoblastoid cell lines. Int. J. Cancer 11:499-520, 1973

Reinsmoen, N., Yunis, E. J., Bach, F. H. und Bach, M. L.: Lymphoblastoid cell lines of homozygous typing cells used for sensitation in PLT. Tissue Antigens. 9:11-16, 1977

Richard, J., Pink, L. und Ziegler A.:Radiolabeling and immunoprecipitation of cell-surface macromolecules. Immunological Methods. 10:169-179, 1979

Rittner, C. H., Hauptmann, G., Grosse-Wilde, H., Grosshans, E., Tongio, M. M und Mayer, S.: linkage between HL-A (major histocompatibility complex) and genes controlling the synthesis of the fourth component of complement. In: Histicompatibility Testing 1975, Munksgaard, Kopenhagen. F. Kissmeyer-Nielsen, ed., pp. 945-954, 1975

Robson, E. B. und Lamm, L. U.: Report of the committee on the genetic constitution of chromosome 6. Cytogent. Cell Genet. 37:47-70, 1984

Rood,J. J. Van, Eernisse, J. G. und Van Leeuwen, A.: Leucocyte antibodies in sera from pregnant women. Nature, 181:1735-1736, 1958

Rood, J. J. Van : Leucozyte grouping. Thesis, Leiden, 1962

Rosenfelder, C., Gouter, A., Choquet, C., Venuat, A. M., Kayibanda, B., Pico, J. L. und Greaves, M. F. : Phenotypic charakterization of a unique non-T, non-B acute lymphoblastic leukemia cell line. Nature. 267:841-843, 1977

Rosenfelder, G., Ziegler, A., Wernet, P. und Braun, D. G. : Ganglioside patterns: New differentiation markers for human hematopoietic cell lines. J. Natl. Canc. Inst. 68:203-209, 1982

Rymo, L., Lindahl, T., Povey, S. und Klein, G. : Analysis of restriction endonuclease fragments of intracellular Epstein-Barr-Virus-DNA and isoenzymes indicate a common origin of the Raji, NC-37 and F-265 human lymphoid cell lines. Virology 115:115-124, 1981

Sachs, E. S., Hoogeboom, A. J. M., Niermeijer, M. F. und Schreuder, G. M. T.: Clinical evidence for localisation of HLA proximal of chromosome 6p22. Lancet. 19:659,1983

Shakelford, D. A., Kaufmann, J. F., Korman, A. J. und Strominger, J. L.: HLA-DR antigens: structure, separation of subpopulations, gene cloning and function . Immunol. Rev. 66:133-187, 1982

Shakelford, D. A., Lampson, L. A. und Strominger, J. L.: Separation of three class II antigens from a homozygous human B cell line J. Immunol. 130:289-296, 1983

Schneider, U., Schwenk, H. U. und Bornkamm, G.: Characterization of EBV-genome negative "Null" and "T" cell lines drived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. Int. J. Cancer. 19:621-626, 1977

Shaw, S., Johnson, A. H. und Shearer, G. M.: Evidence for a new segregant series of B cell antigens that are encoded in the HLA-D region and that stimulate secondary allogeneic proliferative and cytotoxic responses. J. Exp. Med. 152:565-580, 1980

Shaw, S., Duquesnoy, R. J. und Smith, P. L.: Population studies of the HLA-linked SB antigens. Immunogenetics. 14:153-162, 1981

Shaw, S., Kavathas, P., Pollack, M. S., Charmot, D. und Mawas, C.: Family studies define a new histocompatibility locus, SB, between HLA-DR and GLO. Nature. 293:745-747, 1981

Shaw, S., Ziegler, A. und DeMars, R.: Specificity of monoclonal antibodies directed against human and murine class II histocompatibility antigens as analyzed by binding to HLA deletion mutant cell lines. Human Immunol. subm, 1984

Sheehy, M. J., Sondel, P. M., Bach, M. L., Wank, R. und Bach, F. H.: HL-A LD (lymphocyte defined) typing: a rapid assay with primed lymphocytes. Science. 188:1308-1310, 1975

Smithies, O. und Poulik, M. D.: Initiation of protein synthesis at an unusual position in an immunoglobulin gene. Science.175:187-189, 1972

Snary, D., Goodfellow, P., Haymen, M. J., Bodmer, W. F. und Crumpton, M. J.: Subcellular separation and molecular nature of human histocompatibility antigenes (HL-A). Nature. 247:457-461, 1974

Snary, D., Barnstable, C., Bodmer, W. F., Goodfellow, P. und Crumpton, J.: Human Ia antigens purification and molecular structure. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 41:379-386, 1977

Soloski, M. J., Uhr, J. W. und Vitetta, E. S.: Primary structural studies of the Qa-2 alloantigen: implications for the evolution of the MHC. Nature. 296:759-761, 1982

Solheim, B. G. und Thorsby, E.: Evidence of a third HL-A locus. Transpl. Proc. 5:1579-1580, 1973

Sorrentino, R., Corte, G., Galabi, F., Tanigaki, N. und Tosi, R.: Microfingerprinting analysis of human Ia molecules favors a three loci model. Molecular Immunology. 20:333-343, 1983

Steinmetz, M. und Hood, L.:Genes of the major histokompatibility complex in mouse and man. Science.222:727-733, 1983

Studier, F. W.: Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. J. Mol. Biol. 79:237-248, 1973

Sugden, B und Mark, W. : Clonal transformation of adult human leukocytes by Epstein-Barr virus. Journal of Virology. 23:503-508, 1977

Sundstöm, C. und Nilsson, K. : Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). Int. J. Cancer. 17:565-577, 1976

Tanigaki, N. und Tosi, R.: The genetic control of human Ia alloantigens: a three-loci model derived from the immunochemical analysis of "supertypic" specificities. Immunol. Rev. 66:5-37, 1982

Terasaki, P.I. und McClelland, J.D.: Microdroplet assay of human serum cytotoxins. Nature (Lond). 204:998-1000, 1964

Termijtelen, A., Van Leeuwen, A. und Van Rood, J. J.: HLA-linked lymphocyte activating determinants. Immunol. Rev. 66:79-101, 1982

Thompson, R. J und Jackson, A. P. : Cyclic complexes and high avidity antibodies. TIBS. 9:1-3, 1984

Tosi, R., Tanagaki, N., Centis, D., Ferrara, G. B. und Pressman, D.: Immunological dissection of human Ia molecules. J. Exp. Med. 148:1592-1611, 1978

Trägardh, L., Rask, L., Wiman, K., Fohlman, J. und Peterson, P. A. : Structure and sequence of an immunglobulin-like HLA antigen heavy chain domain. Proc. Natl.Acad. Sci. USA. 76:5839-5842, 1979

Trowsdale, J., Lee, J., Carey, J., Grosveld, F., Bodmer, J. und Bodmer, W.: Sequences related to HLA-DR alpha chain on human chromosome 6: restriction enzyme polymorhpism detected with DC alpha chain probes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80:1972-1977, 1983

Uchańska-Ziegler, B., Wernet, P. und Ziegler, A. : A single-step bacterial binding assay for the classification of cell types with surface antigen-directed monoclonal antibodies. Brit. J. Haematol. 52:155-160, 1982

Uchańska-Ziegler, B., Rosenfelder, G., Braun, D. G. und Wernet, P.: Heterogenity of established human hematopoietic cell lines: surface antigens detected by monoclonal antibodies and glycosphingolipid patterns. Leukemia Markers. 15-18:317-320, 1981

Uytdehaag, F., Heijnen, C. J., Pot, K. H. und Ballieux, R. E.: T-T interactions in the induction of antigen-specific human supressor T lymphozytes in vitro. J. Immunol. 123:646-653, 1979

Wernet, P., Winchester, R., Kunkel, H. D., Wernet, D., Giphart, M., van Leeuwen, A. und van Rood J. J.: Serological detection and partial characterization of human MLC determinants with special reference to B cell specificity. Transplant . Proc. 193:200, 1975

Wernet, P.: Human Ia-type alloantigens: methods of detection, aspects of chemistry and biology, markers for disease states. Transplant. Rev. 30:271-298, 1976

Yang, C., Kratzin, H., Götz, H., Thinnes, F. P., Kruse, T., Egert, G., Pauly, E., Kölbel, S., Wernet, P. und Hilschmann, N.: Primärstruktur menschlicher Histokompatibilitätsantigene der Klasse II. 2. Mitteilung : Aminosäuresequenz der N-terminalen 179 Reste der alpha-Katte des HLA-Dw2/DR2-Alloantigens. Hoppe-Seyler's Z. Physiol/ Chem. 363:671-676, 1982

Weitkamp, L. R. und Lamm, L. U.: Report of the committee on the genetic constitution of chromosome 6. Cytogenet. Cell Genet. 32. 130-143, 1982

Williams, A. F.: Assays for cellular antigens in the presence of detergents. Eur. J. Immunol. 3:628-632, 1973

Williams, A. F: Differentiation antigens of the lymphocyte cell surface. In: Contemporary Topics in Molecular Immunology (Ada L, Porter RR, eds) 6:93-95, 1977

Yokoyama, K., Stockert, E., Old, L. J. und Nathenson, S. G.: Structural comparison of TL antigens derived from normal and leukemia cells of TL+ and TL- strains and relationship to genetically linked H-2 major histocompatibility complex products. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78:7078-7082, 1981

Yang, S. Y., Morishima, Y., Collins, N. H., Alton, T., Polack, M. S. Yunis, E. J. und Dupont, B.: Comparison of one-dimensional IEF patterns for serologically detectable HLA-A and B allotypes. Immunogenetics. 19:217-231, 1984

Zeuthen, J., Friederich, U., Rosen, A. und Klein, E.: Structural abnormalities in chromosome 15 in cell lines with reduced expression of Beta-2 microglobulin. Immunogenetics. 4:567-579, 1977

Ziegler, A. und Pink, R.: Chemical properties of two antigens controlled by the major histocompatibility complex of the chicken. J. Biol. Chem. 251:5391-5395, 1976

Ziegler, A. und Milstein, C.: A small polypeptide different from ß2-microglobulin associated with a human cell surface antigen. Nature. 279:243-244, 1979

Ziegler, A., Harrison, S. C und Leberman R.: The minor proteins in tomato bushy stunt and turnip crinkle viruses. Virology. 59:509-515, 1974

Ziegler, A. und Hengartner, H. : Sodium dodecyl sulfate electrophoresis of high molecular weight proteins in N,N'-diallyltartardiamide--cross-linked polyacrylamide slab gels. Eur. J. Immumnol. 7:690, 1977

Ziegler, A., Uchańska-Ziegler, B., Rosenfelder, G., Braun, D. G. und Wernet, P.: Heterogenity of established human hematopoietic cell lines: surface antigens detected by monoclonal antibodies and glycosphingolipid patterns. Academic Press:Leukemia Markers, 317-320, 1981

Ziegler, A., Uchanska-Ziegler. B., Zeuthen, J. und Wernet, P. : HLA antigen expression at the single cell level on a K562 x B cell hybrid : An analysis with monoclonal antibodies using bacterial binding assay. Somat. Cell Genet. 8:775-789, 1982

Ziegler, A., Heinig, J. Müller, C., Götz, H., Thinnes, F. P., Uchanska-Ziegler, B. und Wernet, P.: Analysis by sequential immunoprecipitation of the specifities of monoclonal antibodies TÜ22, 34, 35, 36, 37, 39, 43, 58 and YD1/63.HLK directed against human HLA class II antigens. Human Immunol. subm., 1984

Zinkernagel, R. M. und Doherty, P. C.: Restriction of in vitro T cellmediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semi-allogenetic system. Nature. 248:701-702, 1974

7. Verzeichnis der Abkürzungen

A.dest = entionisiertes Wasser
AS = Aminosäure
Az = Natriumazid
Bq = Bequerel
CML = cell mediated lympholysis
cpm = Counts per Minute
CTX = Mikrozytotoxizitätstest
DMEM = minimal essential medium, modifiziert nach Dulbecco
DMSO = Dimethylsulfoxid
DNS = Desoxyribonukleinsäure
FCS = Fötales Kälberserum
GLO = Glyoxalase
HBSS = Hank's balanced salt solution
Hepes = (N-(2-Hydroxyäthyl)piperazin-N'-2-äthansulfonsäure
HLA = Human Leucozyte Antigen
IE = internationale Einheiten
IEF = Isoelektrische Fokusierung
Ig = Immunglobulin
IgG = Immunglobulin-G
IgM = Immunglobulin-M
LE = Lyseeinheiten
MG = Molekulargewicht
MHC = Major Histocompatibility Complex
MLC = Mixed Lymphocyte Typing
PAGE = Polyacrylamidgelelektrophorese
PBL = Periphere Blutlymphozyten
PEG = Polyäthylenglycol
PLT = Primed Lymphocyte Culture
PMSF = Phenylmethylsulfonylfluorid
RNS = Ribonukleinsäure
SDS = Sodiumdodecylsulfat
UpM = Umdrehungen pro Minute

Lebenslauf

21.11.1955	geboren in Eningen u.A., als Tochter des Georg Maier und seiner Frau Gisela, geb. Wagner
1962-1970	Grund u.-Hauptschule in Eningen u.A.
1970-1972	zweijährige hauswirtschaftlich-pflegerische und sozial-pädagogische Berufsfachschule in Urach
1972-1975	Johannes-Kepler-Gymnasium in Reutlingen
24.5.1975	Reifeprüfung
1975-1981	Studium der Biologie an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen
1980	Diplom-Prüfung
1981	Diplomarbeit über das Thema "Untersuchungen über die Strukturkomponenten zweier fischpathogener Rhabdoviren VHSV und RVC: virale RNS und phosphorylierte Proteine" in der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere.
1982	Heirat mit Dr. Otmar Spring
1981-1984	wiss. Angestellte (SFB 120) der Medizinischen Universitätsklinik in Tübingen
1981-1984	Dissertation über das Thema "Herstellung, Charakterisierung und Anwendung von HLA-Mutanten der humanen Zellinie BJAB.B95.8.6" in der Medizinischen Universitätsklinik, Abt.II (Prof. Dr. H. D. Waller), Immunologisches Labor Dr. P. Wernet, Projekt A4 (Dr.A. Ziegler) im SFB 120.

Meine akademischen Lehrer waren:
Bessler, Braun, Bunke, Engels, Enzmann, Epple, Frey, Gerd, Grell, Grünewald, Guglielmi, Harder, Hantke, Hemleben, Jung, Mayer, Mayer-Brock, Mussgay, Netzel, Rähle, Rieker, Röttger, Sander, Seiler, Seyffert, Schmidt-König, Schönamsgruber, Schwemmle, Tichy, Wenk, Wörz, Zarybnichy, Zähner,

Druck und Verarbeitung: copy shop, darmstadt, tel. 21353